

**A HMG-KoA REDUKTÁZ FUNKCIONÁLIS
VIZSGÁLATA *MUCOR CIRCINELLOIDES*-BEN**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

NAGY GÁBOR

**TÉMAVEZETŐ:
DR. PAPP TAMÁS
EGYETEMI DOCENS**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK**

2015

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2. BEVEZETÉS	8
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
3.1. A Járomspórás gombák (<i>Mucoromycotina</i>) általános jellemzői	10
3.2. A terpén típusú vegyületek jelentőségei	11
3.3. A terpén típusú vegyületek bioszintézise	13
3.4. A HMG-KoA reduktáz	15
3.5. A HMG-KoA reduktáz enzim jelentősége	17
3.6. A HMG-KoA reduktáz szabályozása	20
3.6.1. A HMG-KoA reduktáz szabályozása emberben	20
3.6.2. A HMG-KoA reduktáz szabályozása gombákban	22
3.6.2.1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	22
3.6.2.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
4. CÉLKITŰZÉSEK	24
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	26
5.1. A kísérletek során alkalmazott törzsek	26
5.2. Alkalmazott táptalajok, tápoldatok	26
5.2.1. Minimál tápoldat/táptalaj (YNB).	26
5.2.2. Élesztő-glükóz tápoldat/táptalaj (YEG).	26
5.2.3. Élesztő-pepton-glükóz tápoldat/táptalaj (YPG).	26
5.2.4. Luria-Bertani tápoldat/táptalaj (LB)	26
5.3. Tenyésztési körülmények	27
5.4. Alkalmazott oldatok, pufferek és reagensek	27
5.4.1. Kompetens <i>E. coli</i> sejtek készítéséhez felhasznált oldatok	27
5.4.2. <i>E. coli</i> sejtek transzformációjához felhasznált oldatok	27
5.4.3. DNS gélelektroforézishez használt anyagok	27
5.4.4. Protoplasztképzéshez és PEG-mediált transzformációhoz használt oldatok	27
5.4.5. Northern hibridizáláshoz használt reagensek	28
5.4.6. Mitokondrium festéshez használt reagens	28
5.4.7. Endoplazmás retikulum festéshez használt reagens	29
5.4.8. Apoptózis folyamatainak detektálásához használt reagens	29
5.4.9. Ergoszterin kivonáshoz használt oldatok	29
5.4.10. Membránfrakció izolálásához használt oldatok	29
5.5. Primerek	29
5.6. Alkalmazott plazmidok	31
5.7. Vizsgálati módszerek	32
5.7.1. Genomi DNS kivonása <i>M. circinelloides</i> -ből	32
5.7.2. DNS/RNS gélelektroforézis	32
5.7.3. RNS gélelektroforézis Northern hibridizációhoz	32
5.7.4. DNS visszaizolálása agaróz gélből	32
5.7.5. RNS tisztítása <i>M. circinelloides</i> -ből	33
5.7.6. cDNS szintézis (reverz transzkripció)	33
5.7.7. Alkalmazott PCR technikák és reakciókörülmények	33
5.7.7.1. A <i>hmgR</i> gén amplifikálásához használt reakciókörülmények	33
5.7.7.2. A <i>hmgR</i> gén cDNS amplifikálásához használt reakció körülmények	35
5.7.7.3. A gén csendesítését lehetővé tevő génszakaszok amplifikálásához használt reakciókörülmények	36
5.7.7.4. A jelölt hibridizációs próba készítéséhez használt reakciókörülmények	36

5.7.7.5. A <i>gfp</i> gén amplifikálásához használt reakciókörülmények	37
5.7.7.6. Valós idejű PCR reakciók a kópiaszám, valamint a transzkripció szintek meghatározásához	37
5.7.7.7. A <i>hmgR</i> gének túlműködtetését lehetővé tevő vektorok kimutatására használt PCR reakció:	38
5.7.8. Génklónozás során alkalmazott módszerek, plazmidkonstrukciók létrehozása	38
5.7.8.1. Restrikciós emésztések, ligálás	38
5.7.8.2. Plazmid DNS tisztítása	39
5.7.9. Northern hibridizálás	39
5.7.10. A feltételezett HMG-KoA reduktáz szekvenciák analíziséhez használt szoftverek	40
5.7.11. Kompetens <i>E. coli</i> sejtek készítése	40
5.7.12. Baktérium transzformáció	40
5.7.13. Protoplasztképzés	41
5.7.14. A protoplasztok transzformációja	41
5.7.15. Karotinkivonás	41
5.7.16. A karotinoid kivonatok elemzése	42
5.7.17. Ergoszterinkivonás	42
5.7.18. Ergoszterinkivonatok elemzése	42
5.7.19. A sztatinek minimális gátló koncentrációjának (MIC érték) meghatározása	43
5.7.20. Mikroszkópos vizsgálatok	43
5.7.21. Membránfrakció izolálás	44
5.7.22. A membránfrakció fluoreszcenciájának vizsgálata	44
5.7.23. Statisztikai elemzések	45
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	46
6.1. A <i>Mucor circinelloides</i> 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A reduktáz génjeinek izolálása és a gének elemzése	46
6.2. A <i>M. circinelloides</i> HMG-KoA reduktázainak jellemzése	47
6.3. Az egyes <i>hmgR</i> gének kifejeződésének vizsgálata különböző tenyésztési körülmények között	50
6.3.1. A <i>hmgR</i> gének relatív transzkripció szintjei a tenyésztési időszak alatt	51
6.3.2. A <i>hmgR</i> gének relatív transzkripció szintjei különböző hőmérsékleten	54
6.3.3. Sóstressz hatása a <i>Mucor hmgR</i> génjeinek relatív transzkripciójára	56
6.3.4. A <i>hmgR</i> gének relatív transzkripció szintjei különböző szénforrásokon	57
6.3.5. A <i>hmgR</i> gének relatív transzkripció szintjei aerob és anaerob körülmények között	59
6.3.6. A relatív transzkripció szint mérések legfontosabb eredményei	62
6.4. A <i>hmgR</i> gének funkcionális vizsgálata	63
6.4.1. A <i>hmgR</i> gének túlműködtetése	64
6.4.2. A <i>hmgR</i> gének csendesítését lehetővé tevő vektorkonstrukciók építése	65
6.4.3. A mutáns törzsek növekedésének vizsgálata	67
6.4.4. A <i>hmgR</i> gének túlműködtetésének és csendesítésének hatása transzformáns törzsek makro- és mikromorfológiájára	69
6.4.5. A transzformáns törzsek karotin és ergoszterin tartalmának vizsgálata	75
6.4.6. Apoptotikus folyamatok detektálása	76
6.4.7. A mutáns törzsek sztatinnal szembeni érzékenysége vizsgálat	79
6.4.8. A <i>hmgR</i> gének funkcionális vizsgálatának legfontosabb eredményei	81
6.5. A HMG-KoA reduktázok sejten belüli lokalizációjának vizsgálata	82
6.5.1. A vektor konstrukciókat hordozó transzformánsok vizsgálata	84

6.5.2. Kolokalizációs vizsgálatok az endoplazmatikus retikulummal és mitokondriummal.....	87
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	93
8. SUMMARY.....	98
9. IRODALOMJEGYZÉK	102
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	113
11. MELLÉKLET	114

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AACT	Acetoacetyl-koenzim A tioláz
asRNS	Antiszensz RNS
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands
DMAPP	Dimetilallil-pirofoszfát
DEPC	Dietil-pirokarbonát
DHA	Dihidrox-aceton
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ER	Endoplazmatikus retikulum
ERAD	ER-kapcsolt fehérje degradáció (<i>Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation</i>)
FPP	Farnezil-pirofoszfát
GFP	Zöld fluoreszcens protein (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GGOH	Geranilgeraniol
GGPP	Geranilgeranil-pirofoszfát
GPP	Geranil-pirofoszfát
HMG-KoA	3-hidrox-3-metilglutaril koenzim A
HMGs	HMG-KoA szintáz
HPLC	Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HRD	HMG-KoA reduktáz degradációs útvonal (<i>HMG-CoA reductase degradation pathway</i>)
IDI	IPP izomeráz
IPK	Izopentenil-foszfát kináz
IPP	Izopentenil-pirofoszfát
LB	Luria-Bertani broth (Luria-féle tápleves)
MDC	Mevalonsav-5-difoszfát dekarboxiláz
MEP	Metileritriol-4-foszfát útvonal
MEV	Mevalonsav útvonal
MOPS	3-N-morfolin-propánszulfonsav
MPD	Mevalonsav-5-foszfát dekarboxiláz

MVAP	Mevalonsav-5-foszfát
MVK	Mevalonsav kináz
OD	Optikai denzitás
PCR	Polimeráz láncreakció (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polietilén-glikol
PMC	PEG – szorbitol – MOPS – kalcium-klorid
PMK	Foszfomevalonsav kináz
RNáz	Ribonukleáz
SDS	Nátrium-lauril-szulfát
SMC	Szorbitol – MOPS – kalcium-klorid
SSC	Nátrium-klorid – nátrium-citrát
SZMC	Szegedi Mikrobiológiai Gyűjtemény (<i>Szeged Microbiological Collection</i>)
TAE	Tris – ecetsav – dinátrium-EDTA
TCM	Tris – kalcium-klorid – magnézium-klorid
YEG	Élesztőkivonat-glükóz tápközeg (<i>Yeast Extract - Glucose medium</i>)
YNB	Élesztő nitrogénforrás (<i>Yeast Nitrogen Base</i>)
YPG	Élesztőkivonat – pepton – glükóz tápközeg (<i>Yeast extract - Peptone-Glucose medium</i>)

A doktori értekezésben előforduló legfontosabb gének, illetve fehérjék és enzimek rövidítései:

Mucor circinelloides:

<i>gpd</i>	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
<i>hmgR</i>	3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A reduktáz gén
HmgR	3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A reduktáz
<i>pyrG</i>	orotidin-5-monofoszfát dekarboxiláz

Homo sapiens:

AMPK	AMP-aktivált protein kináz (<i>AMP-Activated Protein Kinase</i>)
gp78	glikoprotein 78
HMGCR	3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A reduktáz

Insig	Inzulin indukálta gén által kódolt fehérje (<i>Insulin-induced gene protein</i>)
P97/VCP	ATP-vezérelt valozint tartalmazó chaperon fehérje (<i>ATP-driven chaperone valosin-containing protein</i>)
SCAP	SREBP hasadást aktiváló fehérje (<i>SREBP Cleavage Activating Protein</i>)
SPFH2	Endoplazmatikus retikulum lipid raft-asszociált fehérje 2 (<i>Endoplasmic reticulum lipid raft-associated protein 2</i>)
SREBP-2	Szterol szabályozó elemet kötő fehérje (<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>)
SREs	Szterol szabályozó elemek (<i>Sterol Regulatory Elements</i>)
TMUB1	Transzmembrán és ubikvitin-szerű domént hordozó fehérje 1 (<i>Transmembrane and ubiquitin-like domain containing protein 1</i>)
ubc 7	Ubikvitin-kapcsolt enzim 7 (<i>ubiquitin-conjugating enzyme 7</i>)

Saccharomyces cerevisiae:

HMG1	3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A reduktáz 1 gén
Hmg1p	3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A reduktáz 1 izoforma
HMG2	3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A reduktáz 2 gén
Hmg2p	3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A reduktáz 2 izoforma
Nsp1p	Insig homológ
Ubc7p	Ubikvitin kapcsolt enzim

Schizosaccharomyces pombe:

Hmg1	3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A reduktáz
Ins1	Insig homológ fehérje
Sty1	Stressz-érzékeny mitogén aktiváló protein kináz

2. BEVEZETÉS

A terpének, azaz az izoprénvázas vegyületek, a természetben előforduló egyik legnagyobb és legváltozatosabb vegyületcsoportot alkotják. Részt vesznek a sejtmembrán felépítésében (koleszterin, ergoszterin) és a sejten belüli biokémiai folyamatokban. Lehetnek színanyagok (karotinok), valamint fontos szerephez jutnak a fotoszintézisben és a fotooxidatív védelemben is. Az élő sejtben betöltött fontos szerepük miatt bioszintézisük intenzíven kutatott terület. Ezenkívül a különböző iparágak is nagy mennyiségben hasznosítják őket.

A járomspórás gombák (Mucoromycotina) közé tartozó *Phycomyces blakesleeanus*, *Blakeslea trispora* és *Mucor circinelloides* a mikrobiális karotinoid bioszintézis tanulmányozásának modellorganizmusai. Közülük a *Phycomyces*-ben tanulmányozták legrészletesebben a karotinoidok bioszintézisének szabályozását. A karotinoidok és az egyéb izoprén származékok bioszintézisének korai szakasza megegyezik. Ez az úgynevezett mevalonsav bioszintézis útvonal (MEV), mely során az acetyl-koenzim A-ból több lépésen keresztül kialakul az öt szénatomos izopentenil-pirofoszfát (IPP), ami a terpének közös építőköve. A mevalonsav bioszintézis útvonal központi lépése a 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-KoA) átalakulása mevalonsavvá, mely lépést a HMG-KoA reduktáz (HmgR) katalizálja. Mivel az enzim a korai izoprén bioszintézis egyik központi lépését határozza meg, így kihatással van az összes terpén termelődésére. A sztatín vegyületek az enzim szelektív gátlószerei. Humán gyógyászatban felhasználják őket a koleszterin szint csökkentésére, de gombaellenes hatásukat is vizsgálják.

Az HMG-KoA reduktáz gének száma az egyes élőlényekben eltérő. Az emlősökben általában egy reduktáz gén található, míg növényekben fajtól függően eltérő számban fordulnak elő. A járomspórás gombák genomja általában egy vagy két reduktáz gént kódol, azonban a *M. circinelloides* genomja 3 ilyen gént tartalmaz (*hmgR1*, *hmgR2* és *hmgR3*). Munkánk során tisztázni szeretnénk az egyes reduktázok specifikus szerepét a gomba izoprén bioszintézisében. Ezért a dolgozatban ismertetett vizsgálatok során a gének izolálását követően kísérletet tettünk a gének kópiaszámának emelésére és azok csendesítésére, valamint megvizsgáltuk, hogy e módosítások milyen hatással vannak a gombára. A gének kifejeződésének vizsgálatával képet szeretnénk kapni az egyes HMG-KoA reduktázok szabályozásáról és a kifejeződésük esetleges eltéréseiről.

Mind gyakorlati, mind pedig elméleti szempontból fontosnak tartottuk megvizsgálni a HMG-KoA reduktáz szerepét a *Mucor* sejten belüli folyamataiban (morfogenezis,

apoptotikus folyamatok és stresszválasz). Ezen ismeretekről kevés információval rendelkezünk, azonban fontosak lehetnek az esetleges biotechnológiai alkalmazások szempontjából. A szabályozó folyamatok feltárása hozzájárulna, hogy az eddigi karotinoid és terpén bioszintézis módosításával kapcsolatos eredmények felhasználásával egy, az iparban is jól használható karotinoid termelő törzset hozzunk létre. Az enzim ergoszterin bioszintézisben betöltött szerepének tisztázása pedig hasznos lehet új, a patogén gombákkal szembeni szerek kifejlesztésében is, valamint a környezethez való alkalmazkodás és a membránszerkezet kialakulásának tanulmányozása területén.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A Járomspórás gombák (Mucoromycotina) általános jellemzői

A Mucoromycotina az egyik legősibb szárazföldi gombacsoport melyhez a hagyományosan járomspórás gombáknak nevezett csoportok tartoznak, nevezetesen a Mucorales, Mortierellales és az Endogonales rend tagjai (Hibbett és mtsi. 2007). A Mucoromycotina tagjainak nagy része elhalt növényi maradványokon élő, szaprofita szervezet. Néhány faj parazita életmódot folytat, de találunk közöttük ektomikorrhiza alkotókat és obligát endoszimbiontákat is (Benny 2001; Benny és mtsi. 2001). Általánosságban elmondható, hogy cönocitikus micéliummal rendelkeznek (1/A ábra), sejtfalukban kitin és kitozán található. Ivartalan szaporító képleteik a sporangiumokban (1/B ábra) képződő sporangiospórák. Nevüket az ivaros szaporodás során létrejövő járomspóráról (zigospóra) kapták. Néhány csoportjukra jellemző a morfológiai dimorfizmus képessége, mellyel a környezeti körülményektől függően felveshetnek fonalas morfológiát, valamint növekedhetnek élesztőszerűen is (1/C ábra) (Ghormade és mtsi. 2012).



1. ábra. A *M. circinelloides* cönocitikus micéliuma (A), sporangiuma (B) és egy élesztőszerű morfológiát mutató sejtje (C).
A méretskála értéke 20 µm.

A járomspórás gombák közé számos ipari és biotechnológiai jelentőségű gombafaj tartozik. Felhasználják őket extracelluláris enzimek (Godtfredsen 1990; Outtrup és Boyce 1990), többszörösen telítetlen zsírsavak (Carter 1988; Ward 1995; Yamada és mtsi. 1992), karotinoidok termeltetésére (Iturriaga és mtsi. 2000, 2001, 2005; Mehta és mtsi. 2003; Dufossé 2006), valamint szteroidvázis vegyületek sztereospecifikus hidroxilálására (Madyastha és Srivatsan 1987). Élelmiszeripari jelentőségük is nagy, mivel több *Mucor*, *Rhizopus* és *Actinomucor* faj képviselője megtalálható fermentációval készülő távol-keleti ételek starter kultúrájában (Han és mtsi. 2001). Számos fajnak jelentősége van a klinikumban is, mivel opportunistá human patogénként súlyos, úgynevezett zigomikózisokat válthatnak

ki legyengült immunrendszerű betegekben (Ribes és mtsi. 2000; Walsh és mtsi. 2004; Chayakulkeeree és mtsi. 2006; Papp és mtsi. 2008).

A járomspórás gombák közül az egyik legjobban kutatott modellorganizmus a *Mucor circinelloides*. Az eddigi vizsgálatok elsősorban a gomba morfogenezisére és annak biokémiájára (Orlowsky 1991; Ruiz-Herrera 1993), a járomspórás gombák „szexferomonjának”, a trispórsavnak a bioszintézisére és a szexuális folyamatokban betöltött szerepére (Gooday 1994; Orlowsky 1994), a fényérzékelés molekuláris alapjainak tisztázására (Silvia és mtsi. 2006), valamint másodlagos metabolitok (pl. karotinoidok) bioszintézisére irányulnak (Iturriaga és mtsi. 1992, 2000, 2001, 2005; Navarro és mtsi. 2000; Papp és mtsi. 2006; Velayos és mtsi. 1997, 2000a, 2000b).

3.2. A terpén típusú vegyületek jelentőségei

A terpének ötszénatomos izoprén egységekből felépülő anyagok, melyek az egyik legnagyobb és legváltozatosabb természetes vegyületcsoportot alkotják (Misawa 2011). Számos terpén típusú vegyületet izoláltak már állatokból, növényekből és mikroorganizmusokból (Misawa 2011). Jelentőségüket mutatja, hogy a különböző iparágak nagy mennyiségben felhasználják őket. A gyógyszeriparban többek közt maláriaellenes szerként (pl. artemisinin) vagy antioxidáns hatásuk miatt táplálékkiegészítőként (pl. karotinoidok), a kozmetikai iparban illatanyagokként (pl. citronellol és geraniol), az élelmiszeriparban pedig szín- (karotinoidok) és aromaanyagokként (pl. limonén és linalool) használják őket. Ugyanakkor találkozhatunk még ezekkel a vegyületekkel a növénytermesztésben, hormonok, illetve hormonhatású vegyületek (giberellinek) formájában, valamint felhasználják őket az állati takarmányozásban a halak húsának és a tojás sárgájának az élénkítése (karotinoidok) céljából is (Misawa 2011).

Ezen kívül a sejtekben számos sejtbiológiai és biokémiai folyamat részét képezik. A karotinoidok a természetben előforduló legnagyobb pigmentcsoport. Fotoszintetizáló szervezetekben részt vesznek a fotoszintézis folyamatában, mint másodlagos fénygyűjtő molekulák (Britton és mtsi. 2008). Számos élőlényben fontos szerepet játszanak a fény által okozott stresszel szembeni védekezésben, illetve a szabadgyökök és a reaktív oxigénfészeségek elleni fotooxidatív védelemben is. Részt vesznek a fototaxis és fototropizmus folyamataiban. Növények virágainak és terméseinek színanyagai és egyes fitohormonok prekursorai lehetnek. A karotinoidok az A vitamin előanyagai, valamint antioxidáns tulajdonságokkal is rendelkeznek (Burton 1989; Paiva és Russel 1999; Naguib 2000). Állati és emberi kísérletekben az egyes karotinoidok (pl. β -karotin, asztaxantin,

likopin) csökkentették a száj-, a prosztatá-, a mellrák és egyéb daganatos elváltozások kialakulásának esélyét (Hennekens és mtsi. 1986; Vainio és Rautalahti 1998; Chew 1993; Chew és mtsi. 1999; Nishino és mts. 2002). Kedvező hatásai miatt egyre növekvő igény van természetes forrásból - így például mikrobiológiai forrásból - származó termékek iránt. Az iparban felhasznált karotinoidok többségét kémiai szintézissel állítják elő, vagy növényekből vonják ki, azonban így csupán néhány vegyület állítható elő nagyobb mennyiségben (Johnson és Schroeder 1995; Bhosale 2004; Dufossé 2006, 2009; Mortensen 2006).

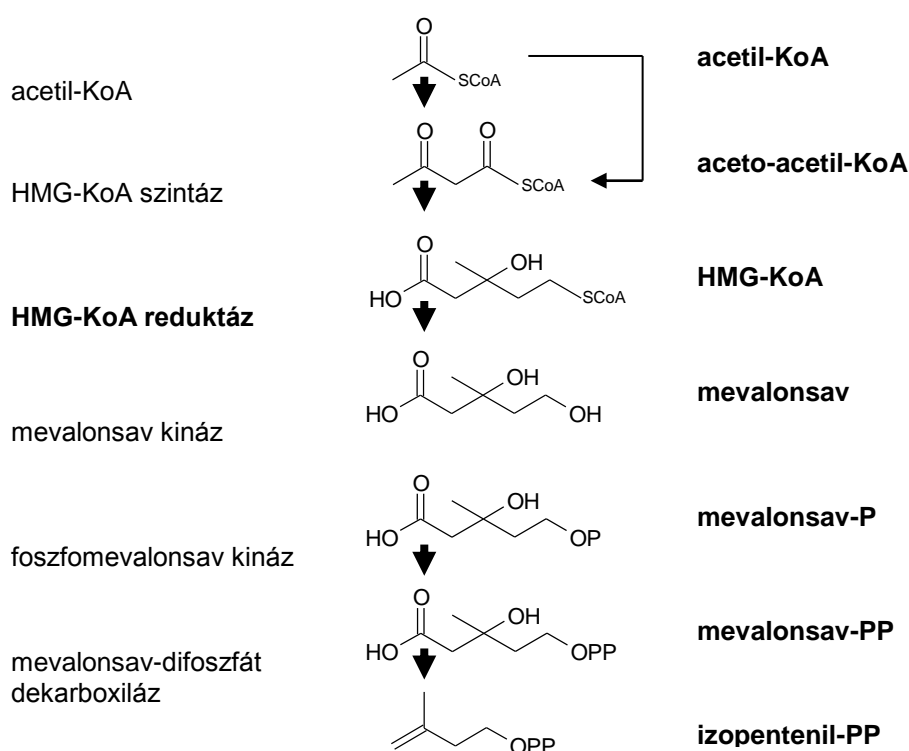
A járomspórás gombák ivaros folyamatai során keletkező járomspóra (zigospóra) kialakulása is szorosan összefügg a karotin bioszintézissel. A két, ellentétes párosodási típusba tartozó törzsben a párosodás során megnövekszik a β -karotin mennyisége (Schimek és mtsi. 2003), ebből a β -karotinból egy 18 szénatomos ketosav, az úgynevezett trispórsav keletkezik. A trispórsav a járomspórás gombákra jellemző szexferomon, amely szerepet játszik az ivaros differenciálódásban és a spóráképzésben is. A trispórsav, a párosodási folyamatoktól függetlenül is, serkenti a β -karotin termelődését. Ezt a hatást csak járomspórás gombáknál lehet kimutatni. *Gilbertella persicaria* esetében a termelt karotinoid mennyisége ötszörösére nőtt a párosodás során (Papp és mtsi. 2009).

A szterinek fontos sejtmembrán alkotók (pl. koleszterin, ergoszterin), melyek felelősek a sejtmembrán szerkezetéért és fluiditásáért (Sharma 2006). A farnezol az opportunistá humán patogén *Candida albicans* élesztő gombában, mint *quorum sensing* molekula játszik szerepet (Hornby és mtsi. 2001), ugyanakkor részt vesz az élesztő-micélium átmenet kialakulásában, így a gomba biofilm képzésében és virulenciájában is. *Saccharomyces cerevisiae*-ben a 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-KoA) reduktáz (HMGR) túltermelésével a farnezol mennyisége jelentősen megnőtt. Emlős sejtekben kimutatták, hogy a farnezol gátolja a mevalonsav bioszintézis útvonalban (MEV) szerepet játszó HMGR-t (Ong és mtsi. 2006).

A farnezil-pirofoszfát (FPP) és a geranilgeranil-pirofoszfát (GGPP) részt vesz a sejt szignáltranszdukciós folyamataiban szerepet játszó, GTPáz molekulacsaládba tartozó, Rho és Ras fehérjék prenilációjában (poszttranszlációs módosítás) is (Goldstein és Brown 1990). A Ras génnek számos eukarióta élőlényben előfordulnak, és fontos szerepet játszanak a sejtek fejlődésében és osztódásában (Boguski és McCormick 1993; Bourne és mtsi. 1990; Ellis és mtsi. 1981; Vojtek és Channing 1998; Kataoka és mtsi. 1984; Powers és mtsi. 1984; Som és Kolaparthi 1994).

3.3. A terpén típusú vegyületek bioszintézise

A terpén vegyületek bioszintézisének első lépése az ötszénatomos izopentenil pirofoszfát (IPP) kialakulása, amely a különböző élőlényekben 3 útvonalon keresztül történhet (Lombard és Moreira 2011). Számos baktériumban, valamint a gombák, növények és állatok esetében az IPP a MEV útvonalon (2. ábra), az acetyl-koenzim A kondenzációjával keletkezik több lépésen keresztül (Lombard és Moreira 2011). Baktériumokban és növények kloroplasztiszában azonosítottak egy másik, az ún. metilerythritol-4-foszfát (MEP) útvonalat, melyben piruvátból és gliceraldehid-3-foszfátból kiindulva alakul ki az IPP (Lombard és Moreira 2011). Eredetüket tekintve a MEV és a MEP bioszintézis egymástól független, nem homológ útvonalakon valósul meg.

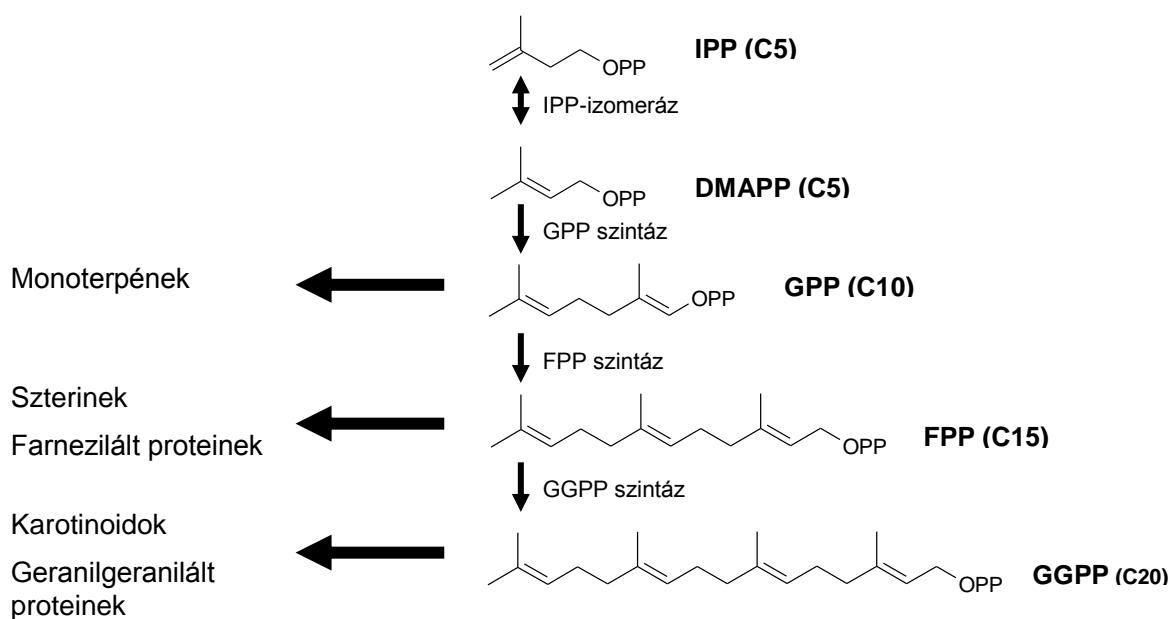


2. ábra. A klasszikus mevalonsav (MEV) útvonal.

Dellas és mtsi. (2013) a legújabb filogenetikai és kísérleti adatok alapján arra a megállapításra jutottak, hogy létezik egy alternatív mevalonsav útvonal is egyes archeákban. Az alternatív és a klasszikus MEV útvonal a mevalonsav-5-foszfát (MVAP) kialakulásáig megegyezik. Míg a klasszikus MEV útvonalon a MVAP – IPP átalakulást a foszfomevalonsav-kináz (PMK) és a mevalonsav-5-difoszfát dekarboxiláz (MDC), addig az alternatív útvonalon egy mevalonsav-5-foszfát-dekarboxiláz (MPD) és egy izopentenil-foszfát-kináz (IPK) katalizálja.

Járomspórás gombákban a klasszikus MEV útvonalon keresztül zajlik a terpének bioszintézise (2. ábra). Első lépésben acetil-koenzim A-ból egy acetoacetyl-koenzim A tioláz (AACT) segítségével acetoacetyl-koenzim A keletkezik, melyet a 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A szintáz (HMGS) alakít át 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A-vá (HMG-KoA). A HMG-KoA a MEV útvonal kulcs intermedierje, melynek redukálását a HMG-KoA reduktáz (HmgR) végzi, létrehozva így a mevalonsavat. A mevalonsavból mevalonsav kináz (MVK) segítségével mevalonsav-5-foszfát jön létre. A PMK a mevalonsav-5-foszfátból mevalonsav-5-difoszfátot képez, ezt a mevalonsav-5-dekarboxiláz (MDC) alakítja át izopentenil-pirofoszfáttá (IPP).

Az IPP kialakulását követően az IPP-izomeráz (IDI) segítségével alakul ki a dimetilallil-pirofoszfát (DAPP). *Streptomyces*-ben felfedeztek egy az IDI-vel nem homológ enzimet, amely ugyanezt a lépést katalizálja (Kaneda és mtsi. 2001).



3. ábra. Az izoprén specifikus bioszintézis útvonal.

Ezt az enzimet IDI2-nek nevezték el, melyet később megtalálták különböző archea genomokban is (Barkley és mtsi. 2004; Dutoit és mtsi. 2008). A DAPP kialakulásával kezdetét veszi az izoprén specifikus bioszintézis útvonal (3. ábra). Egy IPP és egy DAPP összekapcsolódásával jön létre a 10 szénatomos geranil-pirofoszfát (GPP), mely prekursorként szolgál a monoterpének bioszintéziséhez. A monoterpének széleskörben elterjedtek a növényekben és algákban. Leggyakrabban, mint illóolaj-komponensek (citronellol, geraniol) fordulnak elő.

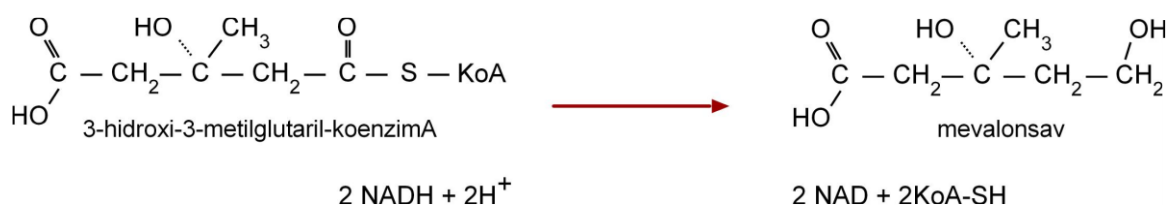
A GPP és egy újabb IPP kondenzációjával, melyet a farnezil-pirofoszfát szintáz katalizál, alakul ki a 15 szénatomos farnezil-pirofoszfát (FPP), melyből a szeszkviterpének (farnezol), triterpének és szterinek alakulnak ki.

Az izoprén bioszintézis útvonal további szakaszában az FPP-hez egy újabb IPP egység kapcsolódásával létrejön a 20 szénatomos geranilgeranil-pirofoszfát (GGPP), melyről a diterpének és a karotinoidok specifikus bioszintézis útvonalai ágazódnak le.

Korábban vizsgálták az egyes terpénszármazékok képződési folyamatait radioaktívan jelölt acetil-KoA, leucin és mevalonsav segítségével az ugyancsak járomspórás *P. blakesleeanus* és *B. trispora* gombákban. Az eredmények azt mutatták, hogy az ergoszterin, a karotinoidok és a triacilglicerinek már az acetil-KoA felhasználásától kezdve egymástól elkülönülve, feltételezhetően specifikus kompartmentekben, de mindenképpen saját külön prekuzorkészlet felhasználásával szintetizálódnak (Bejarano és Credá-Olmedo 1992; Kuzina és mtsi. 2006). Feltehetőleg az ergoszterin és az ubikinon ugyanazon kompartmentben szintetizálódik, ugyanis képződésük során közös prekuzorkészletet használnak.

3.4. A HMG-KoA reduktáz

A 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A reduktáz (HmgR) egy NADP koenzim segítségével működő oxidoreduktáz, mely a MEV útvonal központi lépését katalizálja (4. ábra).



4. ábra. A HMG-KoA redukciója mevalonsavvá.

Filogenetikai elemzések alapján az enzimet két típusba lehet sorolni (Friesen és Rodwell 2004; Heidl és mtsi. 2004; Lombard és Moreia 2011). Az I. típusú enzim eukariótákban, archeákban, néhány proteo és aktinobaktériumban, míg a II. típusba tartozó enzim, baktériumokban és néhány archeában fordul elő. Az I. típusú enzim kettő fő domént tartalmaz. A fehérje N-terminális részén a hidrofil transzmembrán domént, C-terminális részén pedig a hidrofób, katalitikus aktivitásért felelős régiót tartalmazza. A két domén között egy rövid linker régió található. Ezzel szemben a II. típusú enzim nem tartalmaz transzmembrán és linker régiót, az enzim sejten belül szolubilis formában van jelen. A

biokémiai vizsgálatok azt mutatják, hogy a két osztály azonos eredetű aktív centrummal rendelkezik. Ugyancsak megegyezik a homodimer képzésük, viszont eltérő a kofaktor használatuk és másképp hatnak rájuk a sztatínok. A sztatínok a HMG-KoA reduktáz szelektív gátlószerei, melyeket koleszterinszint csökkentésre használnak a humán gyógyászatban. Az I. típusú enzim sokkal érzékenyebb ezekre a vegyületekre, mint a II. típusú (Friesen és Rodwell 2004).

A HMG-KoA reduktáz gén szekvenciájára és fehérje szerkezetére vonatkozó adatok számos eukarióta szervezetben ismertek, mint például *Arabidopsis thaliana* (Caelles és mtsi. 1989), *S. cerevisiae* (Basson és mtsi. 1988), *Drosophila melanogaster* (Gertler és mtsi. 1988), *Rhizomucor miehei* (Lukács és mtsi. 2009), *P. blakesleanus* (Ruiz-Albert és mtsi. 2002).

A HMG-KoA reduktáz gének az egyes organizmusokban eltérő számban fordulnak elő. Emlősökben általában egy, míg növényekben fajtól függően egy multigén család kódolja őket (Stermer és mtsi. 1994). A gének száma a gombákban is igen változatos. *Schizosaccharomyces pombe* esetében egy (Lum és mtsi. 1996), míg *S. cerevisiae* esetében kettő HMG-KoA reduktáz gént (Basson és mtsi. 1986) azonosítottak. A járomspórás gombák genomja egy vagy több HMG-KoA reduktáz gént kódol. Az *Absidia glauca* (Burmester és Czempinski 1994), *P. blakesleanus* (Ruiz Albert és mtsi. 2002), *R. miehei* (Lukács és mtsi. 2009) egy, a *M. mucedo* és a *Parasitella parasitica* (Burmester és Czempinski 1994) kettő *hmgR* gént hordoz. Több járomspórás gomba HMG-KoA reduktázának egy rövid szakaszát összehasonlítva, arra a következtetésre jutottak, hogy a járomspórás gombák szétválása előtt egy génduplikációs esemény történt a járomspórás gombák őseiben (Ruiz-Albert és mtsi. 2002). Később egyes fajok az egyik gént elvesztették, míg más fajokban további duplikáció is történt (Lukács és mtsi. 2009). A legújabb kutatási eredmények azt mutatják, hogy a járomspórás gombák esetében nem csak génduplikációs események, hanem teljes genom duplikáció is történhetett (Gryganskyi és Muszewska 2014).

Az I. típusú enzim transzmembrán régiója fajtól függően meglehetősen variábilis, általában 2-8 transzmembrán hélixet tartalmaz. A járomspórás gombák közül a *R. miehei* HMG-KoA reduktáza 7, míg a *P. blakesleanus* esetében 8 transzmembrán szakaszt hordoz. A hidrofób N-terminális rész a transzmembrán hélixeken kívül tartalmaz egy ún. szterol érzékelő domént (SSD) is, mely részt vesz az enzim poszttranszlációs szabályozásában (Loftus és mtsi. 1997; Brown és Goldstein 1999; Davies és Ioannou 2006). A HMG-KoA reduktáz igen erős szabályozás alatt áll, mely a transzkripció, a transláció és a poszt-

transzláció szintjén is megnyilvánul (Goldstein és Brown 1990). A fehérje C-terminális régiója, mely az enzim katalitikus aktivitásáért felelős, erősen konzervált (Hampton és Rine 1994).

Az enzim sejten belüli lokalizációja eltérő lehet. Általában az endoplazmatikus retikulumhoz (ER) horgonyzódik ki, de van példa peroxiszómális és mitokondriális lokalizációra is. Emlősök esetében a HMG-KoA reduktáz (HMGCR) egy 97 kDa nagyságú protein, mely hét transzmembrán régió segítségével az endoplazmatikus retikulum membránjához horgonyzódik (Liscum és mtsi. 1985). Ugyanakkor kimutatták, hogy létezik egy második izoforma is, amely az előzőtől függetlenül kódolt és a peroxiszómák mátrixában fordul elő (Breitling és Krisans 2002). A peroxiszómális HMGCR a normál enzimaktivitás 5%-át teszi ki (Keller és mtsi. 1986), mérete kisebb, mindössze 90 kDa (Engfelt és mtsi. 1997), és szabályozásában is eltér az ER-ben előforduló enzimétől (Aboushadi és mtsi. 2000). Az extrémofil *Hortaea werneckii* gombában két izoformáját azonosították az enzimnek, melyek közül egyik a mitokondriumban, a másik pedig az ER-ben lokalizálódik (Vaupotič és Plemenitas 2007). A *A. thaliana* genomjában két HMG-KoA reduktáz gén található, melyekről az enzimnek három izoformája keletkezik. A három izoforma egyenként 75 kDa nagyságú és egy vagy két transzmembrán régiót hordoznak, mely segíti az enzim szállítását az ER-ből a mitokondriumba vagy a kloroplasztisba (Learned és Fink 1989; Leivar és mtsi. 2005; Stermer és mtsi. 1994.).

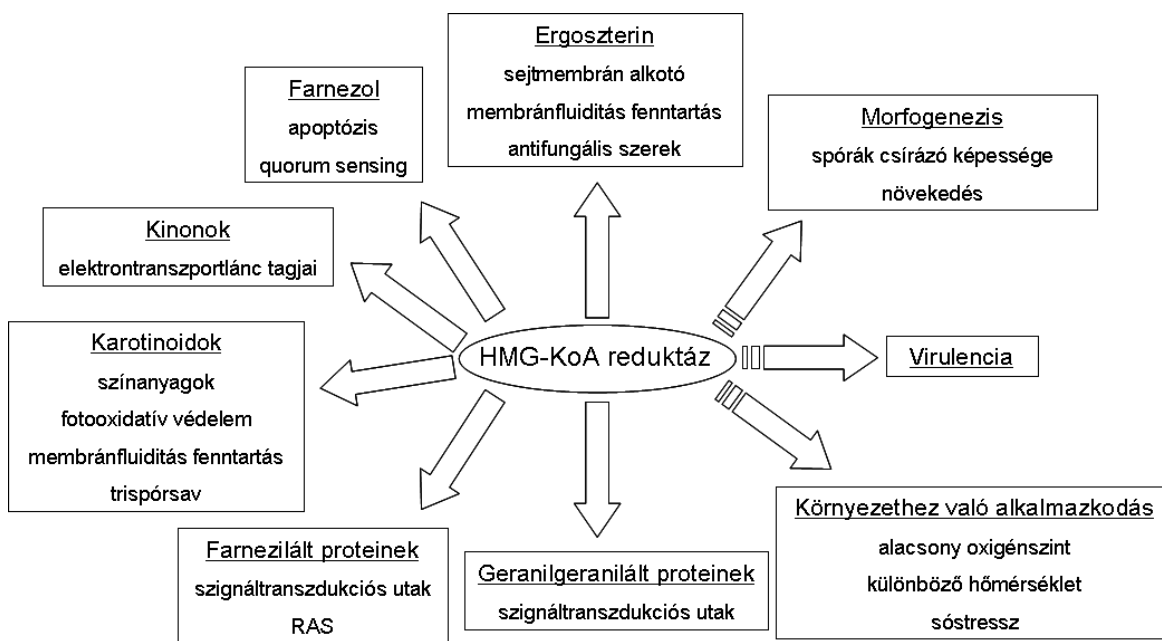
A *S. cerevisiae* genomja két HMG-KoA reduktáz izoenzimet kódol (Hmg1p és Hmg2p). Mind a két fehérje az ER-hez kötődik, de azon belül elkülönül a lokalizációjuk egymástól (Koning és mtsi. 1996). A Hmg1p az ER sejtmag felőli részén helyezkedik el és részt vesz az ER proliferációjában, míg a Hmg2p az ER periferiáján található. Feltehetőleg a Hmg2p fontos szerepet tölt be az anaerob körülményekhez való adaptálódásban, ugyanis kifejeződése anaerob körülmény között megnő, míg a Hmg1p kifejeződése lecsökken. Különbőség van a két enzim szabályozásában is. A Hmg1p enzim sokkal stabilabb és a Hmg2p-vel ellentétben a degradációjában nem játszanak szerepet a mevalonsav bioszintézis út nem-szterin metabolitjai.

3.5. A HMG-KoA reduktáz enzim jelentősége

Az irodalomból ismert, hogy a HMG-KoA átalakulása mevalonsavvá a MEV bioszintézis út központi, sebességmeghatározó lépése. A mevalonát útvonal végén keletkező IPP-vel veszi kezdetét a terpén specifikus útvonal. Az útvonalon keletkező egyes izoprén

termékek hatással vannak a MEV útvonal enzimeire, köztük a HMG-KoA reduktáz keletkezésére, stabilitására és degradációjára (Goldstein és Brown 1990).

A HMG-KoA reduktáz sejten belül betöltött központi szerepe a különböző izoprénvázis vegyületek bioszintézisére gyakorolt közvetlen hatásában fejeződik ki, melyek olyan változásokat indukálnak, amik alapvető hatással lehetnek az adott organizmus morfogenezisére, virulenciájára és/vagy a megváltozott környezethez való adaptálódási képességére. Az 5. ábrán az enzim közvetlen és közvetett hatásai láthatóak.



5. ábra. A HMG-KoA reduktáz közvetlen (nyíl) és közvetett (szaggatott nyíl) hatása a különböző sejten belüli folyamatokra.

Számos kutatás indult a HMG-KoA reduktáz karotinoid bioszintézisben betöltött szerepének tanulmányozására az elmúlt években. A *Candida utilis* tartalmazza az izoprének bioszintéziséhez szükséges prekursorokat és enzimeket, azonban nem képes karotinoidok termelésére. Bakteriális eredetű génekkel transzformálva az élesztőt, karotinoid termelő törzset hoztak létre (Misawa és Shimada 1997). Iszolálták a *C. utilis* HMG-KoA reduktáz 1 génjét (*hmgR1*), melyet túlműködtetve az élesztő sejtben, sikerült a MEV útvonalon keresztül a termelt karotinoid mennyiségét négyszeresre növelni. Mindeközben az ergoszterin mennyisége alig változott. Hasonló módon hoztak létre karotinoid termelésre alkalmas *S. cerevisiae* törzset is, melyben a *C. utilis hmgR1* génjének katalitikus doménjét túlműködtetve fokozni tudták a karotin produkciót (Verwaal és mtsi. 2007). Yan és munkatársai (2012) karotin termelő, rekombináns *S. cerevisiae*-ben képesek voltak a HMG-KoA reduktáz túlműködtetése mellett úgy növelni a termelődő karotinoid mennyiséget, hogy

közben ketokonazzal gátolták az ergoszterin bioszintézis utat. Ezáltal az izoprén specifikus bioszintézis úton keletkező FPP nagy része a karotin bioszintézisre fordítódott. A *R. miehei* HMG-KoA reduktáz génjét izolálva és *M. circinelloides*-ben túlműködtetve nem tapasztaltak a karotin termelésben szignifikáns változást, ugyanakkor a transzformánsok sztatinnal szembeni érzékenysége jelentősen csökkent (Lukács és mtsi. 2009).

Basson és munkatársai (1986) megfigyelték, hogy *S. cerevisiae*-ben az enzim fontos szerepet játszik a spórák csírázásában és a vegetatív sejtek növekedésében. Létrehoztak olyan deléciós mutáns törzseket, melyekben hol az egyik, hol a másik *HMG* gént törölték. Arra a megállapításra jutottak, hogy a sejt életben maradása szempontjából elégséges egyetlen *HMG* gén, viszont a két gén egyidejű deléciója letális (Basson és mtsi. 1987; Seong és mtsi. 2006). Az izoprén specifikus bioszintézis útról leágazó termékek, köztük a farnezol és geranilgeranol, negatív visszacsatolással szabályozza élesztőben a gén kifejeződését.

Joo és Jetten (2010) munkájukban leírták, hogy emlős sejtekben a farnezol indukálta apoptózist az enzimszint mennyiségének csökkenése kísérte, ezenkívül az enzim gátlása révén az ER-ben stresszválasz indukálódik, mely szintén apoptózishoz vezet. *C. albicans*-ban szintén megfigyelték a farnezol szerepét az apoptotikus folyamatokban (Shirtliff és mtsi. 2009). Emlős és gomba sejtekben a sztatinnal – a HMG-KoA reduktáz szelektív gátlószerei – a protein prenilációjának indirekt gátlásán keresztül gátolják a Ras fehérje termelődését. Lovasztatinnal indukált apoptózist humán rákos sejtvonalakban is megfigyeltek (Agarwall és mtsi. 1999). Korábban vizsgálták a *M. racemosus* Ras fehérjéinek (RAS1, RAS2 és RAS3) kifejeződését és a sejtek morfológiájára kifejtett hatását (Roze és Linz 1998). Mindhárom RAS fehérje kifejeződése a fonalas növekedés során volt erőteljes, míg az élesztőszerű növekedés alatt kifejeződésük csökkent. A preniláció gátlása (a HMG-KoA reduktáz kompetitív gátlószereinek alkalmazásával) akadályozta a RAS fehérjék érését, ezáltal csökkent a gomba növekedése és a sporangiospórák kialakulásának a mértéke is. Ezen változások a gombasejtekben apoptózis-szerű folyamatokat indítottak el, melyek végül a gombasejtek halálához vezettek (Roze és Linz 1998).

Halofil élesztőgombákban az enzim hozzájárul a halotoleráns fenotípus kialakításához. *H. werneckii* esetében az optimális sókoncentráció mellett az enzim degradációjának mértéke csökkent, míg az optimálistól eltérő, magasabb, illetve alacsonyabb sókoncentráció mellett az enzim aktivitása megnőtt. Lovasztatinnal történő kezelés hatására ozmotikusan szenzitív fenotípus jelent meg (Vaupotič és mtsi. 2008). Az extrém környezethez való alkalmazkodás az extrémofil mikroorganizmusok számára létfontosságú. *Haloferax volcanii* archea baktériumnál a sókoncentráció változásával

párhuzamosan változott a sejtmembrán lipid- és karotinoid tartalma (Bidle és mtsi. 2007). Sóérzékeny *S. cerevisiae* esetében leírták, hogy mind alacsony, mind magas sókoncentráció mellett 2-6 szorosára nőtt az enzim aktivitása. A termelődő fehérje mennyisége párhuzamban állt az enzim aktivitásával. Az eredmények azt mutatták, hogy az enzim részt vesz a sóstresszhez való alkalmazkodásban.

A HMG-KoA reduktáznak nem csak a környezethez való alkalmazkodásban és a sejten belüli biokémiai folyamatokban van szerepe, hanem patogén gombákban kihat a virulenciára is. Seong és munkatársai (2006) létrehoztak egy olyan mutáns *Fusarium graminearum* törzset, melyben a HMG-KoA reduktáz katalitikus doménje érintetlen maradt, azonban a transzmembrán régióban mutáció történt. Ezekben a mutánsokban a növekedési ráta lelassult, valamint csökkent virulenciát mutattak búzanövénnyel szemben.

Növényekben az izoprén bioszintézis út egyes termékei (szterinek, fitoalexinek, hormonok, karotinoidok) fontos szerepet töltenek be a fiatal növény növekedésében és fejlődésében. A HMG-KoA reduktáz gén aktivitása és kifejeződése az egyes szövetekben specifikusan meghatározott időben történik. Az intenzív sejtosztódás során (a magfejlődés korai szakaszában) a legmeghatározóbbak azok az izoprén komponensek, melyek részt vesznek a membránok kialakításában, illetve azok, melyek az elektron transzportlánc tagjai (Moore és Oishi 1993). A magfejlődés során és az embrióban igen magas HMG-KoA reduktáz aktivitás értéket mértek (Stermer és mtsi. 1994).

3.6. A HMG-KoA reduktáz szabályozása

3.6.1. A HMG-KoA reduktáz szabályozása emberben

Emberben a HMGCR egyik fő transzkripciósfaktora az úgynevezett szterin regulációs elem-kötő fehérje 2 (SREBP-2) (Horton és mtsi. 2002; Burg és Espenshade 2011). Az ER-hez kötődő SREBP komplexet alkot az ugyancsak membrán kötött, a SREBP hasítását aktiváló fehérjével (SCAP). Az így létrejött SREBP-SCAP komplex érzékeli a sejten belüli szterin szintet. Az Insig (inzulin indukálta gén által kódolt fehérje) képes a HMGCR-t transzkripcionálisan és poszttranszlációsán is szabályozni. A transzkripcionális szabályozás során az Insig meggátolja a SREBP aktivációját. Alacsony koleszterinszint esetén az Insig lehetővé teszi a SREBP-SCAP komplex aktivációját és az ER-ből a Golgi apparátusba történő szállítását. A Golgi apparátusban a SREBP-ről két proteolitikus hasítás eredményeként a fehérje N-terminális transzkripciósfaktor doménje leválik. Ez a domén belép a sejtmagba, ahol úgynevezett szterol regulációs elemeket (SREs) ismer fel. A

transzkripció faktor kötődik a HMGCR promóterében található SRE elemhez és megindítja a gén transzkripcióját (Burg és Espenshade 2011).

Az Insig nem csak a HMGCR aktiválásában vesz részt, hanem a degradációjában is az úgynevezett szterin-érzékelő visszacsatolási-gátlási rendszeren keresztül. Magas szterin szint mellett az Insig köti a HMGCR N-terminális részét, ezáltal megtörténik az enzim ubiquitinálódása és gyors degradációja. Az Insig együttműködik a gp78 (glikoprotein 78) membrán kötött ubiquitin E3 ligázzal, mely a citoplazma felőli oldalán magához toborozza az ubc7-t (ubikvitin kapcsolt fehérje), valamint a p97/VCP (ATP-vezérelt valozin tartalmazó chaperon fehérje) ATP-át. A membránban a gp78-t köti a TMUB1 (transzmembrán és ubikvitin-szerű domént tartalmazó fehérje) az SPFH2 (endoplazmatikus retikulum lipid raft-asszociált fehérje). Az így létrejövő komplex hatására ubiquitinálódik a HMGCR, leválik a membránról és elindul a degradációja. Ezt az Insig-függő lebontást kétféle szignál váltja ki: a szterinszármazékok és a 20 szénatomos geranilgeraniol (GGOH). Mindkét szignál hatással van a HMGCR degradációjára, de különböző módon. A GGOH nem szükséges a HMGCR ubiquitinálódásához, de fokozza azt, míg bizonyos oxisztaterek és a koleszterin bioszintézis köztiterméke a 24,25-dihidrolanoszterol szükséges az Insig-HMGCR kötődésért. Mivel a koleszterin szintézis erősen oxigénigényes folyamat, alacsony oxigénszint mellett a lanoszterol metil csoportjainak eltávolítása gátolt, így ez a köztitermék felhalmozódik a sejten belül elősegítve a HMGCR-Insig kötődést. Egy molekula koleszterin acetyl-CoA-ból történő szintézise során 11 molekula dioxigén szükséges, mely 9 a metil csoportoknak a lanoszterolról való eltávolításához szükséges (Nguyen és mtsi. 2007).

Létezik egy Insig független mechanizmus is. Metabolikus stressz során ez a mechanizmus segíti a sejt ATP felhasználását. Ez a sejtanyagcsere állapot az, amely szabályozza a HMGCR degradációját. Az AMPK (AMP-aktivált protein kináz) egy heterotrimer komplex, mely két szabályozó alegységet (β és γ) és egy katalitikus alegységet (α) tartalmaz. A γ köti az adenozin nukleotidokat és részt vesz az energiaérzékelésben. Az AMP allosterikusan aktiválja az AMPK-t, erre az ATP nem képes, mivel az AMP és az ATP versenyez az AMPK kötőhelyért. Az AMPK képes érzékelni az AMP: ATP arányt és ennek megfelelően növeli a katalitikus aktivitását. Ha aktiválódott, akkor képes az enzimen található (S872) aminosavat foszforilálni, így csökkenti a HMGCR aktivitását. A foszforilálás eredményeként az enzim NADP-hoz való affinitása lecsökken. A defoszforiláció képes teljesen helyreállítani az enzim működését. A defoszforilációt a PP2A nevű protein foszfatáz végzi (Burg és Espenshade 2011).

3.6.2. A HMG-KoA reduktáz szabályozása gombákban

Gombák esetében e folyamatokat legalaposabban a *Sch. pombe* és a *S. cerevisiae* élesztőkben tanulmányozták.

3.6.2.1. *Schizosaccharomyces pombe*

A *Sch. pombe* egy HMG-KoA reduktázzal (Hmg1) rendelkezik, mely 8 transzmembrán hélixet tartalmaz (Lum és mtsi. 1996). Az enzimben, a humán reduktázhoz hasonlóan, fellelhető az AMPK általi foszforiláció célpontjául szolgáló szerin (S1024). Megtalálható a hasadó élesztőben egy Insig homológ (Ins1) fehérje is, mely az emlős Insiggel ellentétben nem szabályoz a SREBP-SCAP útvonalon keresztül, de stabil komplexet képez a Hmg1-gyel. Az Ins1 nem-degradatív útvonalon keresztül szabályozza a *Schizosaccharomyces* Hmg1-t. Az Ins1-Hmg1 komplex elősegíti a S1024 és a T1028 foszforilációját, ezáltal csökkentve az enzim aktivitását. Ez a gátlás növeli a NADP Km értékét. Ezt a foszforilációt ozmotikus stressz és alacsony glükóz szint indukálja. Ozmotikus stressz és minimál táptalajon való növekedés során a Hmg1 foszforilációjához szükséges a Sty1 (stressz-érzékeny mitogén aktiváló protein kináz), a Wis4 és Wis1. Alacsony glükóz szint erősen indukálja a Hmg1 foszforilációját. Ennek szabályozásában részt vesz a PP2A-hoz hasonló Ppe1 foszfataz és annak negatív regulátora, az Sds23. A Ppe1 az enzim defoszforilációjáért felelős, azonban magas glükóz szint esetén az Sds23 meggátolja a Ppe1 működését. Emlősben a HMGCR foszforilációja alacsony glükóz szint mellett az AMPK-n keresztül zajlik. A *Sch. pombe* AMPK homológ nem szükséges a glükóz-függő foszforilációhoz. Ellenben, ahogy az emlős sejtekben az AMPK γ alegység, úgy az Sds23 is tartalmaz CBS domént, ami felveti annak lehetőségét, hogy a Hmg1 szabályozásában, az emlős HMGCR-éhez hasonlóan, szerepe van az adenozin nukleotid szint érzékelésének.

A hasadó élesztőben megtalálható az úgynevezett Sre1 és Scp1 fehérje, melyek SREBP és SCAP ortológok (Hughes és mtsi. 2005, 2007). A Sre1 is tartalmaz egy hélix-hurok-hélix motívumot, melynek segítségével képes az emlősökben található SRE elemekhez kötődni (Todd és mtsi. 2006). A SCAP és Scp1 fehérjék azonossága csak arra a három konzervált szterin-érzékelő doménra korlátozódik, melyek ahhoz elegendőek, hogy a fehérjét az endoplazmatikus retikulumba tartsák

A Sre1 részt vesz azokban a folyamatokban, melyekkel a sejt képes a környezet oxigén koncentrációját érzékelni és adaptálódni az alacsony oxigénkoncentrációhoz (Espenshade 2006; Hughes és mtsi. 2005; Todd és mtsi. 2006). Anaerob körülmények között a Sre1 fehérje aktiválódik és felhalmozódik a sejtben. Transzkripcionális

aktivátorként kezd el viselkedni, mely olyan gének átíródását aktiválja, melyek szükségesek az alacsony oxigén szint melletti növekedéshez. Ezek olyan enzimek génjei, amelyek nagy mennyiségű oxigént igénylő folyamatokat katalizáló reakciókban vesznek részt (pl. az ergoszterin, hem, szfingolipid, és ubikinon bioszintézis egyes oxigén igényes lépései) (Todd és mtsi. 2006).

3.6.2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

A *S. cerevisiae* két HMG-KoA reduktáz génje (HMG1, HMG2) különböző módon regulálódik. Aerob körülmények között hem képződik, mely aktiválja a Hap1p transzkripciós faktort. Ezután a Hap1p aktiválja a HMG1 transzkripcióját. Ezzel párhuzamosan egy, még ismeretlen mechanizmus gátolja a HMG2 kifejeződését. Mevalonsav éhezettett sejtekben akkumulálódik a Hmg1p fehérje és emelkedett aktivitást mutat. A Hmg2p, az emlős sejtekhez hasonlóan, az ER-kapcsolt degradáció (ERAD) útján szabályozódik. A Hmg2p-t felismeri és ubiquitinálja a membrán kötött HRD (HMG-KoA degradációs útvonal) komplex. A membrán kötött Hrd1P E3 ligáz az Ubc7p (ubikvitin konjugáló enzim) fehérjével ubiquitinálja a Hmg2p-t, mely ezután leválik a membránról és degradálódik. A Hmg2p degradációját a nem szterin izoprének és a szterinek kontrollálják. A nem szterin izoprének közül a 20 szénatomos GGPP a legfontosabb szignálkomponens. Az emelkedett Hmg2p aktivitás növeli a keletkező GGPP mennyiségét, mely negatív visszacsatolás útján indukálja az enzim degradációját. A szterin szignál, az oxiszterin, mely ugyan nem szükséges az enzim degradációjához, de fokozza azt. A *S. cerevisiae*-ben az Insig ortológját Nsp1p-nek nevezik, mely köti a Hmg2p-t és szabályozza a fehérje mennyiségét és stabilizálja azt (Burg és Esphensade 2011).

Az élesztő nem rendelkezik SREBP és SCAP fehérjékkel. Alacsony szterin szint esetén az Upc2p és Ecm22p transzkripciós faktorok kontrollálják a szterin bioszintézist (Vik és Rine 2001). Ezek a fehérjék a SREBP génnel nem mutatnak homológiát (Dimster-Denk és Rine 1996; Smith és mtsi. 1996). Alacsony oxigén szint esetén az Upcp2 az AUS1 és PDR11 ABC transzporterek expresszióját indukálja, melyek segítik az exogén szterin felvételt.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Mivel a HMG-KoA reduktáz a terpén bioszintézis korai szakaszának központi lépését katalizálja, hatással lehet számos vegyület, többek közt a karotinoidok és az ergoszterin, valamint az ubikinon és egyes fehérjék prenil csoportjainak képződésére. Közvetlenül vagy az említett metabolitok szintézisének keresztül olyan fontos biológiai folyamatokat befolyásolhat, mint a membrán szerkezet kialakítása, a különböző környezeti faktorokhoz való alkalmazkodás, a morfogenezis, vagy az apoptotikus folyamatok. Mindezeket figyelembe véve fő célunk a karotinoid termelő járomspórás gomba, a *M. circinelloides* HMG-KoA reduktáz génjeinek azonosítása, funkcionális vizsgálata és az izoprén bioszintézisben betöltött, esetlegesen eltérő, szerepük tisztázása.

Ennek érdekében a következő konkrét célokat tűztük ki magunk elé:

1. A *M. circinelloides* HMG-KoA reduktáz génjeinek izolálása és elemzése.

2010-ben fejeződött be a *M. circinelloides* teljes genomszekvenciájának meghatározása (<http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html>), mely nagymértékben megkönnyíti az izoprén bioszintézisben szerepet játszó gének azonosítását és jellemzését. Célul tűztük ki egyes rokon fajok *hmgR* gén szekvenciájának segítségével homológ génszakaszok keresését a *M. circinelloides* genomban, majd az így talált szekvenciák *in silico* elemzését. Az így nyert adatok alapján terveztük a legnagyobb homológiát mutató, feltételezett gének izolálását és klónozását is.

2. A *hmgR* gének kifejeződésének vizsgálata különböző tenyésztési körülmények között.

Terveink között szerepelt, hogy valós idejű kvantitatív PCR segítségével megvizsgáljuk az azonosított gének transzkripcióját eltérő környezeti feltételek, illetve tenyésztési körülmények mellett. A vizsgálat során választ kaphatunk arra, melyek azok a specifikus körülmények, amikor a gének átíródása indukálódik és, hogy a vizsgált körülmények esetén van-e különbség a három gén kifejeződése között.

3. A *hmgR* gének kópiaszámának emelése és a gének csendesítése.

A gének izolálását követően, olyan vektorkonstrukciók létrehozását terveztük, melyek a gének túlműködtetését és a csendesítését teszik lehetővé és így alkalmasak lehetnek a funkció vizsgálatára. A sikeres transzformációt követően megvizsgálhatjuk az

egyes reduktáz gének szerepét a sejtek növekedésére, a sztatinokkal szembeni érzékenységre és a termelődő karotinoidok és ergoszterin mennyiségi változására.

4. Az egyes HmgR fehérjék sejten belüli lokalizációját.

További terveink között szerepelt az egyes reduktáz fehérjék sejten belüli lokalizációjának vizsgálata. Ennek érdekében olyan vektorkonstrukciók létrehozását terveztük, melyekben az egyes reduktáz fehérjék transzmembrán régióját kódoló génszakaszt zöld fluoreszcens fehérje génjével fuzionáltatjuk. Az endoplazmatikus retikulum és a mitokondrium festését követően vizsgálhatóvá válhat ezen organelumok és a reduktáz fehérjék esetleges kolokalizációja.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. A kísérletek során alkalmazott törzsek

A transzformációs kísérletek során a *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus* (CBS 277.49 izolátum) *leuA⁻* és *pyrG⁻* kétszeres auxotróf mutáns MS12 törzsét (SZMC 12082) alkalmaztuk.

A plazmid klónozási munkákat *Escherichia coli* TOP10F⁻ törzsszel végeztük.

5.2. Alkalmazott táptalajok, tápoldatok

5.2.1. Minimál tápoldat/táptalaj (YNB): 1% D-glükóz, 0,15% (NH₄)₂SO₄, 0,15% Na-L-glutaminát, 0,05% YNB (Difco), szükség esetén 0,05% uracillal vagy 0,05% leucinnal kiegészítve (pH 4,5). Szilárd táptalaj előállításához 2% agart adtunk a tápoldathoz. PEG-közvetített protoplaszt transzformáció során a protoplasztokat 0,8 M szorbitolt és 1% agart tartalmazó YNB fedőagarral összekeverve (pH 3,2) öntöttük 0,8 M szorbitollal kiegészített, 2% agart tartalmazó YNB táptalajra.

A D-glükózt kísérlettől függően maltózzal, trehalózzal, nátrium-acetáttal, dihidroxiacetonnal helyettesítettük. A sóstressz hatásának vizsgálatához a tápoldatot/táptalajt 1, 2 illetve 3% nátrium-kloriddal egészítettük ki.

5.2.2. Élesztő-glükóz tápoldat/táptalaj (YEG): 1% D-glükóz, 0,5% élesztőkivonat, szilárd táptalaj előállításához 2% agart adtunk a tápoldathoz.

5.2.3. Élesztő-pepton-glükóz tápoldat/táptalaj (YPG) (pH 4,5): 1% D-glükóz, 1% pepton, 0,5% élesztőkivonat, szilárd táptalaj előállításához 2% agart adtunk a tápoldathoz. A protoplasztok regeneráltatása során 0,8 M szorbitollal kiegészített YPG tápoldatot alkalmaztunk.

5.2.4. Luria-Bertani tápoldat/táptalaj (LB) (pH 7,0): 1% NaCl, 1% tripton, 0,5% élesztőkivonat, szilárd táptalaj előállításához 2% agart adtunk a tápoldathoz. A transzformáns törzsek szelekciójához 100 µg/ml ampicillinnel egészítettük ki a tápközeget.

5.3. Tenyésztési körülmények

A gombatorzseket YNB táptalajon (szükség esetén uracillal vagy leucinnal kiegészítve), kéthavonkénti átoltással, 4 °C-on tartottuk fenn. Tenyésztésük általában 25 °C-on, négy napig, állandó megvilágítás mellett történt. Esetenként a hőmérsékletet (20-37 °C között), a tenyésztési időt (leoltástól számított 4. óra – 4. nap) a kísérleteknek megfelelően változtattuk. Az anaerob tenyésztéseket BBL GasPak Anaerobic System (Beckton Dickinson) segítségével végeztük. Későbbi felhasználás esetén a táptalajról vagy tápoldatból gyűjtött micéliumot (desztillált vizes mosás után) fagyasztva tároltuk.

Az *E. coli* törzs tenyésztése ampicillinnel kiegészített (100 µg/ml) LB tápoldatban/táptalajon történt 37 °C-on egy éjszakán keresztül. Felhasználásig a baktériumsejteket -70 °C-on tároltuk.

5.4. Alkalmazott oldatok, pufferek és reagensek

5.4.1. Kompetens *E. coli* sejtek készítéséhez felhasznált oldatok

100 mM CaCl₂ oldat, hűtve tárolva

70% glicerin

5.4.2. *E. coli* sejtek transzformációjához felhasznált oldatok

TCM puffer: 10 mM Tris (pH 7,5); 10 mM CaCl₂; 10 mM MgCl₂

Antibiotikum törzsoldat: 50 mg/ml ampicillin (Sigma) törzsoldat steril desztillált vízben oldva

5.4.3. DNS gélelektroforézishez használt anyagok

TAE puffer: 40 mM Tris-ecetsav (pH 7,6); 1 mM Na₂EDTA

Agaróz gél: a fragmentum mérettől függően 0,8-2% agaróz TAE pufferben oldva

Etidium-bromid törzsoldat (Sigma): 10 mg/ml desztillált vízben oldva

Mintapuffer: 6x DNS mintapuffer (Thermo Scientific)

Molekulasúly marker: 1 kb DNS marker (Thermo Scientific): steril desztillált víz – molekulasúly marker – 6x DNS mintapuffer 4:1:1 arányú keveréke

5.4.4. Protoplasztképzéshez és PEG-mediált transzformációhoz használt oldatok

Protoplasztáló oldat: 100 mM nátrium-foszfát puffer; 0,8 M szorbitol; 1,5% csigaenzim

Nátrium-foszfát puffer (100 mM): 25 mM Na_2HPO_4 ; 75 mM NaH_2PO_4

SMC puffer: 50 mM CaCl_2 ; 10 mM MOPS; 0,8 M szorbitol

PMC puffer: 40% PEG 4000; 10 mM MOPS; 0,6 M szorbitol; 50 mM CaCl_2

5.4.5. Northern hibridizáláshoz használt reagens

Tri Reagent (Sigma-Aldrich)

Kloroform (VWR)

Izopropanol (VWR)

Dietil-pirokarbonát (Sigma)

75% etanol DEPC kezelt vízzel hígítva

10x MOPS puffer: 200 mM MOPS (pH 7,0); 50 mM nátrium-acetát (pH 5,2); 10 mM EDTA (pH 8,0)

Futtató elegy: 72,2% DEPC kezelt víz; 10% 10x MOPS oldat; 17,8% formaldehid (VWR)

Mintafelvívő puffer: 12,9% 10x MOPS; 22,6% formaldehid (Sigma); 64,5% formamid (Sigma)

TC puffer: 25% Tris-HCl (pH 8,0); 40% glicerol (80%-os); 1% brómfenolkék

20x SSC (pH 7,0): 3 M NaCl; 0,3 trinátrium-citrát

Előhibridizációs puffer: 22,5% NaCl (4 M); 67,5% DEPC kezelt víz; 10% SDS (10%)

Hibridizációs puffer: 22,5% NaCl (4 M); 67,5% DEPC kezelt víz; 10% dextrán-szulfát (Sigma); 1% SDS

Lazac sperma DNS (10 mg/ml, Invitrogen)

Mosó pufferek: 2x SSC; 0,1% SDS

0,1x SSC; 0,1% SDS

1. detektáló puffer (pH 7,5): 0,01 M maleinsav; 0,015 M NaCl;

2. detektáló puffer: 1% blokkoló reagens (Roche) 1. detektáló pufferben

3. detektáló puffer (pH 9,5): 0,1 M Tris-HCl; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl_2

Alkalikus foszfát antitest-konjugátum (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche)

Színreakciós előhíváshoz: NBT-BCIP törzsoldat (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche); nitroblue tetrazólium-klorid és 5-bromo-4-kloro-3-indolilfoszfát toluidin só keveréke

5.4.6. Mitokondrium festéshez használt reagens

MitoTracker Red FM (Life Technologies) fluoreszcens festéket alkalmaztuk a gyártó utasításainak megfelelően.

5.4.7. Endoplazmás retikulum festéshez használt reagens

Er-Tracker Red (BODIPY TR Glibenclamide (Life Technologies) fluoreszcens festéket alkalmaztuk a gyártó utasításainak megfelelően.

5.4.8. Apoptózis folyamatainak detektálásához használt reagens

Apoptosis detection kit-et (Sigma) használtuk a gyártó utasításainak megfelelően.

5.4.9. Ergoszterin kivonáshoz használt oldatok

25% KOH etanol:metanol 2:3 elegyében oldva

5.4.10. Membránfrakció izolálásához használt oldatok

Homogenizáló puffer (pH 7.2): 250 mM szacharóz; 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl

5.5. Primerek

A PCR reakciókhoz számos indítószekvenciát terveztünk, melyeket felhasználtunk teljes gének (genomi, illetve cDNS) felszaporításához és szekvenálásához, valamint a valós idejű PCR reakciónál az egyes gének relatív transzkripció szintjeinek meghatározásához. Az 1. táblázat tartalmazza a vizsgálatokhoz tervezett indítószekvenciákat.

1. táblázat. A kísérletek során használt indítószekvenciák.

Primer	5'-3'	Termék	A termék mérete (bp)
A <i>hmgR</i> gének amplifikálásához használt indítószekvenciák			
Hmg-coA2f	GGCCTGCAGATGATCAATCTGCTGTCCTAT	<i>hmgR1</i>	3740 (gDNS)
Hmg-coA2r	TTCGCGGCCGCTATAAGATGCAATTCCCCGTT		3346 (cDNS)
Hmg-coA3f	TTCGTCGAATGTTGAAAAACGTCAAAAAGAT	<i>hmgR2</i>	3595 (gDNS)
Hmg-coA3r	TTCGCGGCCGCTATGATTTAATACTTCCA		3222 (cDNS)
Hmg-coA4f	TTCGTCGACATGGCGTCTGCTCTCCCCATCA	<i>hmgR3</i>	3491 (gDNS)
Hmg-coA4r	TTCGCGGCCGCTTAGGATTGATGCAGGTT		3345 (cDNS)
A qPCR analízishez használt indítószekvenciák			
H1_RT_F	CAGAAACAACCTCACATGCCTTGCC	<i>hmgR1</i> gén	151
H1_RT_R	TAATAGCTGGAAGTGGATCGTCGG	egy szakasza	
H2_RT_F	CTCGTATCATCTGTGCCTCTG	<i>hmgR2</i> gén	107
H2_RT_R	AGCAGTGTTACGGTTGTGAG	egy szakasza	
hmgR3_RTf	GAATCCAGTCTGTTGCCTCTCCA	<i>hmgR3</i> gén	128
hmgR3_RTTr	GAGTCACCGTCAATGTTTCATGGGA	egy szakasza	
MCactinF	CACTCCTTCACTACCACCGCTGA	aktin gén egy	117
MCactinR	GAGAGCAGAGGATTGAGCAGCAG	szakasza	

Primer	5'-3'	Termék	A termék mérete (bp)
A bejuttatott plazmidok kimutatására használt indítószekvenciák			
Gpdp	CATGAAGTGTGAGACATTGCGA	<i>gpdP</i> 3' vége	
png1rev	TGTTGTCTCGATTGAATGGCTGG	<i>hmgR1</i> gén 5' vége	656
png2rev	TCCACAGGATTGGCGGTCTAT	<i>hmgR2</i> gén 5' vége	869
png3rev	CAGCGTGTGGTCAATGGTGT	<i>hmgR3</i> gén 5' vége	538
A géncsendesítéshez és a Northern hibridizációhoz használt indítószekvenciák			
H1CSf	TTCGCGGCCGCTCACTGGCTTCATGAACCGGCT	<i>hmgR1</i> gén egy szakasza	662
H1CSr	CCGCTCGAGAGCAATGTTCTTCATAATCCGAA		
H2CSf	TTCGCGGCCGCGAGATAACCCGTTCCGATATTTG	<i>hmgR2</i> gén egy szakasza	626
H2CSr	CCGCTCGAGATCATTGTCATGTAGTTTGGTTGT		
H3CSf	TTCGCGGCCGCTCCAGCGTCTTTGGCAAAGGCA	<i>hmgR3</i> gén egy szakasza	697
H3CSr	TTCCTCGAGGGTGTCCCGTGTGGAGAGCGAC		
A fehérjék lokalizációjának vizsgálata során használt indítószekvenciák			
GFP _{h1c1}	TTAGCTAGCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT	gfp a <i>hmgR1</i> -hez	
GFP _{h1c2}	TTAGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCA		
GFP _{h2c1}	CGCGAATTCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT	gfp a <i>hmgR2</i> -höz	717 bp
GFP _{h2c2}	TTAGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCA		
GFP _{h3c1}	GCGGAATTCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT	gfp a <i>hmgR3</i> -hoz	
GFP _{h3c2}	TTAGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCA		
Az egyes <i>hmgR</i> gének cDNS-einek szekvenáltatásához használt indítószekvenciák			
H1cDNS1	ATGATCAATCTGCTGTCCTATAAATC	<i>hmgR1</i> cDNS	
H1cDNS2	AGGTGCGCCCAATTTATACACGGTG		
H1cDNS3	TACTCTAGCAACCACTATCTTCATG		
H1cDNS4	ATAGCGACCACCAATTTGCTGATGAC		
H1cDNS5	GTGAAAAGCTTGCTAGCCGAGATCT		
H1cDNS6	GAAATCATGTTTCATGCCCATTCGCTC		
H1cDNS7	CAGGTAGCAATGGCCGCAAGCTGC		
H1cDNS8	CTATAAGATGCAATTTCCCGTTACAG		
H2cDNS1	ATGTTGAAAAACGTCAAAAAAGAT	<i>hmgR2</i> cDNS	
H2cDNS2	CAAGTAACAGGGCGGGTGTGATGTTG		
H2cDNS3	GGCATATGTGCGCTTGTGTTTGCC		
H2cDNS4	GCTGCTTTGCTACATTGAACAGATAG		
H2cDNS5	GTTATATCCAAATGGCTGACTATCGCT		
H2cDNS6	GATTTGCATATCGGGATATCTCTCTG		
H2cDNS7	CATTCAACTCGACCTCTCGTTTGTCTCG		
H2cDNS8	CTATGATTTAATACTTCCAGGA		
H3cDNS1	ATGGCGTCTGCTCTCCCCATCAT	<i>hmgR3</i> cDNS	
H3cDNS2	GTTTCATGTACAAGGACACGAAGGT		
H3cDNS3	CATGGCAGACAACATTGACATTATC		
H3cDNS4	GATGGCCTTGTACGAGGAGGATGCA		
H3cDNS5	GACATGGGACACTTGCCCTGTTGGT		
H3cDNS6	CAGCCGTGATGATTTTCAGCGCCATCT		
H3cDNS7	CTTGTGTGGAATTCCCTTCCATCAT		
H3cDNS8	TTAGGATTTGATGCAGGTTCCAGGA		

Az aláhúzott nukleotidok jelölik az indítószekvenciák 5' végére tervezett restriktions hasítóhelyeket.

5.6. Alkalmazott plazmidok

A kísérleteinkhez különböző transzformációs vektorokat hoztunk létre, melyeket a *M. circinelloides* MS12 leucin/uracil kettős auxotróf törzsbe jutattunk be (2. táblázat). A transzformációs vektorok mindegyike tartalmazza a *Mucor gpdI* (glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz gén (EMBL azonosító: AJ293012) promóter és terminális (*gpdIP* és *gpdIT*) régióját. Ez által biztosítottuk a kifejeztetni kívánt gének megfelelő expresszióját. A szabályozó régiókon kívül mindegyik vektor tartalmazta az orotidin-5-foszfát-dekarboxilázt kódoló és az uracil auxotrófiát komplementáló, *pyrG* gént (Benito és mtsi. 1992), melyet szelekciós markerként alkalmaztunk. A vektorok építéséhez a korábbi munkák során létrehozott pPT43 és pPT81 (Papp és mtsi. 2006) vektorokat használtuk. A pPT43 hordozza a *Mucor gpdT* és *gpdP* szabályozó régiókat, a pPT81 ezen szabályozó régiókon kívül tartalmazza a *pyrG* gént is.

A *hmgR* gének cDNS szekvenciájának meghatározásához és a génklónozási munkákhoz a pJET1.2 (Thermo Scientific) vektort alkalmaztuk. A *gfp* gén felszaporításához a laborunkban korábban létrehozott pPT43/gfp vektort használtuk.

2. táblázat. A kísérletek során felhasznált és létrehozott plazmidok és főbb tulajdonságaik.

Plazmid	Leírás (zárójelben a szelekciós markerek)
Génklónozáshoz alkalmazott plazmidok	
pJET 1.2	Klónozó vektor (Amp)
A hmgR gének túlműködtetéséhez alkalmazott plazmidok	
pPT43	<i>Mucor gpdP</i> és <i>gpdT</i> (Amp)
pPT81	<i>Mucor gpdP</i> és <i>gpdT</i> (Amp és <i>pyrG</i>)
pNG1	Expressziós kazetta; <i>Mucor gpdP</i> , <i>hmgR1</i> , <i>gpdT</i> (Amp és <i>pyrG</i>)
pNG2	Expressziós kazetta; <i>Mucor gpdP</i> , <i>hmgR2</i> , <i>gpdT</i> (Amp és <i>pyrG</i>)
pNG3	Expressziós kazetta; <i>Mucor gpdP</i> , <i>hmgR3</i> , <i>gpdT</i> (Amp és <i>pyrG</i>)
A hmgR gének csendesítésére használt vektorok	
pAS1	A <i>hmgR1</i> 5' régiójából 662 nukleotidot tartalmazó részt hordoz, fordított orientációban a pPT43 <i>gpdP</i> és <i>gpdT</i> közé építve (Amp és <i>pyrG</i>)
pAS2	A <i>hmgR2</i> 5' régiójából egy 662 nukleotidot tartalmazó részt hordoz, fordított orientációban a pPT43 <i>gpdP</i> és <i>gpdT</i> közé építve (Amp és <i>pyrG</i>)
pAS3	A <i>hmgR3</i> 5' régiójából egy 662 nukleotidot tartalmazó részt hordoz, fordított orientációban a pPT43 <i>gpdP</i> és <i>gpdT</i> közé építve (Amp és <i>pyrG</i>)

Plazmid	Leírás (zárójelben a szelekciós markerek)
A fehérjék sejten belüli lokalizációjának vizsgálatához alkalmazott plazmidok	
pPT43/gfp	A <i>gfp</i> gén <i>gpdP</i> és <i>gpdT</i> közé építve (Amp és <i>pyrG</i>)
pH1cGFP	A pNG1 plazmidban található <i>hmgR1</i> gén transzmembrán régiót kódoló génszakaszának fúziója <i>gfp</i> -vel (Amp és <i>pyrG</i>)
pH2cGFP	A pNG2 plazmidban található <i>hmgR2</i> gén transzmembrán régiót kódoló génszakaszának fúziója <i>gfp</i> -vel (Amp és <i>pyrG</i>)
pH3cGFP	A pNG3 plazmidban található <i>hmgR3</i> gén transzmembrán régiót kódoló génszakaszának fúziója <i>gfp</i> -vel (Amp és <i>pyrG</i>)

5.7. Vizsgálati módszerek

5.7.1. Genomi DNS kivonása *M. circinelloides*-ből

A genomi DNS kivonást MasterPure Yeast DNA purification kittel (Epicentre) végeztük a gyártó utasításait követve.

5.7.2. DNS/RNS gélelektroforézis

A nukleinsav mintákhoz mintapuffert adtunk, majd a várt fragmentumok és a gél méretétől, illetve a kísérlettől függően 0,8–2% agaróz gélben, 80–110 V feszültséggel, 1–4 órán keresztül végeztük az elválasztást. Mind az agaróz gél készítéséhez, mind futtatópuffernek TAE puffert használtunk. A nukleinsavakat etídium-bromidos festéssel (0,5 µg/ml), UV fény alatt detektáltuk. A fragmentumok méretének meghatározásához különböző molekulásúly markereket használtunk.

5.7.3. RNS gélelektroforézis Northern hibridizációhoz

A nukleinsav mintákhoz mintapuffert adtunk, majd 1,2% agaróz gélben 110 V feszültséggel 2–2,5 órán keresztül végeztük az elválasztást. Az agaróz gél készítéséhez 10x MOPS oldatot és DEPC kezelt vizet használtunk. Az agarózzal történő forralás után lehűtöttük a gél 60 °C-ra és formaldehidet adtunk hozzá.

5.7.4. DNS visszaizolálása agaróz gélből

A visszaizolálni kívánt DNS fragmentumokat tartalmazó gélrészletet steril szikével UV lámpa alatt vágtuk ki a 0,8% agarózt tartalmazó gélből. A DNS-t a DNA Extraction Kit

(Thermo Scientific) vagy a Zymoclean Large fragment DNA Recovery Kit (ZymoResearch) segítségével nyertük ki a gyártó utasításainak megfelelően.

5.7.5. RNS tisztítása *M. circinelloides*-ből

Az RNS tisztítását E.Z.N.A Total RNA Kit II-vel (OmegaBiotek) végeztük a gyártó utasításait követve. A Northern hibridizációhoz az RNS tisztítást Tri-reagenssel (Sigma) végeztük a gyártó utasításait követve.

5.7.6. cDNS szintézis (reverz transzkripció)

Az RNS mintákat DNáz-zal (ThermoScientific) kezeltük, a gyártó utasításai szerint:

- 1 µg RNS
- 1x reakciópuffer (2,5mM MgCl₂-dal)
- 1U RNáz inhibitor (Thermo Scientific)
- 1U DNáz

A reakciót 30 percig 37 °C -on végeztük, majd 5 mM EDTA-val 65 °C -on történő 10 perces kezeléssel állítottuk le. Minden minta esetében PCR, illetve qPCR reakciók segítségével ellenőriztük a minták DNS mentességét.

A DNáz kezelt RNS mintákból a reverz transzkripciót Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) segítségével végeztük el. A reakcióhoz oligo(dT)18 és random hexamer primereket használtunk a gyártó utasítása szerint.

5.7.7. Alkalmazott PCR technikák és reakciókörülmények

Kísérleteink során különböző PCR technikákat alkalmaztunk. A PCR reakciókat T3 Thermocycler (Biometra) készülékben végeztük, a real-time PCR esetében C1000 Thermal Cycler készüléket és CFX96 Real-Time System (Bio-Rad) detektáló rendszert használtunk.

5.7.7.1. A *hmgR* gének amplifikálásához használt reakciókörülmények

A gének genomi DNS-ből történő amplifikálásához a *Long PCR* Enzim Mix-et (Thermo Scientific) használtuk a gyártó ajánlásai szerint. A reakciókat 25 µl végtérfogatban mértük össze a következők szerint:

- 20-50 ng genomi DNS
- 0,4-0,4 µM specifikus primer (1. táblázat)
- 0,2 mM dNTP mix

1x Long PCR puffer (1,5 mM MgCl₂-vel kiegészítve)

1,25U Long PCR Enzim Mix

Az amplifikálás körülményei a *hmgR1* gén esetében:

95 °C	3 perc	1 ciklus	elődenaturálás
95 °C	1 perc	30 ciklus	denaturálás
60 °C	1 perc		primer kötődés
72 °C	5 perc		láncszintézis
72 °C	10 perc	1 ciklus	végso láncszintézis

Az amplifikálás körülményei a *hmgR2* gén esetében:

95 °C	3 perc	1 ciklus	elődenaturálás
95 °C	1 perc	5 ciklus	denaturálás
40 °C	1 perc		primer kötődés
72 °C	5 perc		láncszintézis
95 °C	1 perc	5 ciklus	denaturálás
55 °C	1 perc		primer kötődés
72 °C	5 perc		láncszintézis
95 °C	1 perc	25 ciklus	denaturálás
65 °C	1 perc		primer kötődés
72 °C	5 perc		láncszintézis
72 °C	10 perc	1 ciklus	végso láncszintézis

Az amplifikálás körülményei a *hmgR3* gén esetében:

95 °C	3 perc	1 ciklus	elődenaturálás
95 °C	1 perc	5 ciklus	denaturálás
45 °C	1 perc		primer bekötődés
72 °C	5 perc		láncszintézis
95 °C	1 perc	5 ciklus	denaturálás
58 °C	1 perc		primer bekötődés
72 °C	5 perc		láncszintézis

95 °C	1 perc	} 25 ciklus	denaturálás
68 °C	1 perc		primer bekötődés
72 °C	5 perc		láncszintézis
72 °C	10 perc		végso láncszintézis

5.7.7.2. A *hmgR* gének cDNS amplifikálásához használt reakció körülmények

A reverz transzkripciót követően a teljes cDNS-ből történő amplifikáláshoz *Phusion High-Fidelity* DNS Polimerázt (Thermo Scientific) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A reakciókat 50 µl végtérfogatban mértük össze a következők szerint:

20-50 ng cDNS (reverz transzkripciót követően)
 0,5-0,5 µM specifikus primer (1. táblázat)
 200 µM dNTP mix
 1x *Phusion* HF vagy GC puffer (1,5 mM MgCl₂-vel kiegészítve)
 1U *Phusion High-Fidelity* DNS Polimeráz

Az amplifikálás körülményei a *hmgR1* és *hmgR2* esetében:

95 °C	3 perc	1 ciklus	elődenaturálás
95 °C	0,5 perc	} 30 ciklus	denaturálás
55 °C	1 perc		primer kötődés
72 °C	3,4 perc		láncszintézis
72 °C	7 perc	1 ciklus	végso láncszintézis

Az amplifikálás körülményei a *hmgR3* esetében:

95 °C	3 perc	1 ciklus	elődenaturálás
95 °C	0,5 perc	} 30 ciklus	denaturálás
60 °C	1 perc		primer kötődés
72 °C	3 perc		láncszintézis
72 °C	7 perc	1 ciklus	végso láncszintézis

5.7.7.3. A gének csendesítését lehetővé tevő génszakaszok amplifikálásához használt reakciókörülmények

A gének csendesítéséhez a korábban létrehozott pNG vektorokat alkalmaztuk. A PCR reakciók során *Taq* DNS Polimerázt (Zenon) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A reakciót 25 µl végtérfogatban mértük össze a következők szerint:

20-50 ng plazmid DNS

0,5-0,5 µM specifikus primer (1. táblázat)

200 µM dNTP mix

10x *Taq* puffer

2,5 mM MgCl₂

2U *Taq* DNS Polimeráz

Az amplifikálás körülményei:

95 °C	3 perc	1 ciklus	elődenaturálás
95 °C	0,5 perc	30 ciklus	denaturálás
60 °C	1 perc		primer kötődés
72 °C	0,5 perc		láncszintézis
72 °C	7 perc	1 ciklus	végző láncszintézis

5.7.7.4. A jelölt hibridizációs próba készítéséhez használt reakciókörülmények

A génpróba készítéséhez templátként a laborunkban korábban létrehozott pAS vektorokat használtuk. A reakciókat PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) segítségével állítottuk össze 25 µl-es végtérfogatba a következők szerint:

20-50 ng plazmid DNS

1 µM – 1 µM specifikus primer (1. táblázat)

0,1 mM dNTP mix (Thermo Scientific)

0,1 mM PCR DIG mix (DIG-11-dUTP-t tartalmaz, Roche)

1x *Expand High Fidelity* puffer (1,5 mM MgCl₂-dal kiegészítve)

2U *Expand High Fidelity* enzim

Az amplifikálás körülményei:

95 °C	3 perc	1 ciklus	elődenaturálás
-------	--------	----------	----------------

95 °C	0,5 perc	} 30 ciklus	denaturálás
60 °C	1 perc		primer kötődés
72 °C	0,5 perc		láncszintézis
72 °C	7 perc	1 ciklus	végző láncszintézis

5.7.7.5. A *gfp* gén amplifikálásához használt reakciókörülmények

A *gfp* gén amplifikálásához a laborunkban korábban létrehozott pPT43/*gfp* vektort használtuk. A PCR reakció során *Phusion High-Fidelity* DNS Polimerázt (Thermo Scientific) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A reakciót 25 µl végtérfogatban mértük össze a következők szerint:

20-50 ng plazmid DNS
 0,5-0,5 µM specifikus primer (1. táblázat)
 200 µM dNTP mix
 1x *Phusion* HF puffer (1,5 mM MgCl₂-vel kiegészítve)
 1U *Phusion High-Fidelity* DNS Polimeráz

Az amplifikálás körülményei:

95 °C	3 perc	1 ciklus	elődenaturálás
95 °C	0,5 perc	} 30 ciklus	denaturálás
60 °C	1 perc		primer kötődés
72 °C	0,5 perc		láncszintézis
72 °C	7 perc	1 ciklus	végző láncszintézis

5.7.7.6. Valós idejű PCR reakciók a kópiaszám, valamint a transzkripció szintek meghatározásához

A méréseket monosporangialis telepekből izolált DNS-ből, illetve RNS-ből reverz transzkripcióval előállított cDNS-ből végeztük el. A reakciókat Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific) segítségével mértük össze. A nyert eredményeket a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszer segítségével értékeltük ki (Livak és Schmittgen 2001).

A reakciók összemérése 20 µl végtérfogatban történt 96 lyukú lemezekben:

20-50 ng DNS vagy cDNS
 0,4 µM - 0,4 µM specifikus primer (1. táblázat)
 1x *Maxima SYBR Green qPCR Master Mix*

95 °C	3 perc	1 ciklus kezdeti	denaturáció
95 °C	1 perc	40 ciklus	denaturáció
60 °C	0,5 perc		primerkötődés
72 °C	0,5 perc		láncszintézis

Melting curve analízis:

55 °C -95 °C 10 másodperc 0,5 °C -onként emelkedő hőmérséklet

5.7.7.7. A *hmgR* gének túlműködtetését lehetővé tevő vektorok kimutatására használt PCR reakció:

A *hmgR* gének túlműködtetéshez használt vektorok kimutatásához *Taq* DNS polimerázt (Zenon) alkalmaztunk. A reakciókat 25 µl végtérfogatban mértük össze a következő szerint:

20-50 ng genomi DNS
 0,4-0,4 µM specifikus primer (1. táblázat)
 0,4 mM dNTP mix
 1x *Dupla-Taq* puffer
 2,5 mM MgCl₂
 2 U *Dupla-Taq* DNA Polymerase

az amplifikálás körülményei:

95 °C	3perc	1 ciklus	elődenaturáció
95 °C	1perc	30 ciklus	denaturáció
58 °C	1perc		primerkötődés
72 °C	5perc		láncszintázis
72 °C	10perc	1 ciklus	végző láncszintázis

5.7.8. Génklónozás során alkalmazott módszerek, plazmidkonstrukciók létrehozása

5.7.8.1. Restriktációs emésztések, ligálás

A restriktációs emésztéseket, ligálásokat az általánosan használt módszerek szerint végeztük (Sambrook és mtsi. 1989) követve a gyártók utasításait, valamint optimalizálva az adott kísérleti körülményekhez. A DNS fragmentumokat a CloneJet PCR cloning Kit-ben

található pJET1.2 (Thermo Scientific) klónozó vektorba építettük a gyártó utasításait követve.

5.7.8.2. Plazmid DNS tisztítása

Plazmid DNS tisztításához a Viogene Mini-M Plasmid DNA Extraction System (Viogene), nagyobb mennyiségű plazmid DNS tisztításához a Viogene Midi-V100 Plasmid DNA Extraction System (Viogene) kiteket használtuk a gyártó utasításai szerint.

5.7.9. Northern hibridizálás

Az RNS minták izolálását követően az RNS integritás ellenőrzése céljából a mintákat 2% agart tartalmazó gélben megfuttattuk. A felületek és a futtatókádak 10% H₂O₂-dal történő RNáz mentesítése után az RNS mintákat denaturáló formaldehid-agaróz gélelektroforézissel elválasztottuk. A mintákat 96% etanolban kicsaptuk (2 óra, -70 °C, majd centrifugálás (15.000 g, 10 perc) után DEPC kezelt desztillált vízbe vettük fel. 20-25 µg RNS-t 6 µl desztillált vízbe feloldottunk és 19,4 µl mintafelvivő puffert adtunk hozzá. A mintákat 65 °C-on 10 percig, majd jégen 10 percig inkubáltuk. Az inkubálást követően 2,5 µl TC puffert adtunk hozzá. A mintákat 1% MOPS és 17,8% formaldehidet tartalmazó pufferben futtattuk. Az elválasztott RNS-t, 20x SSC-t használva blottoló pufferként, kapilláris transzferrel átvittük a hibridizációs membránra. Hibridizációs membránként Amersham Hybond-N⁺ (GE Healthcare) membránt alkalmaztunk.

A hibridizációs membránt legalább két órán át 65 °C-on előhibridizációs pufferrel, majd 16 órán át 65 °C-on, jelölt próbát tartalmazó hibridizációs oldattal hibridizáltuk. Az előhibridizációs oldatot (20 ml) 100 µl, míg a hibridizációs oldatot 50 µl lazac spermaDNS-sel (10 µg/ml) egészítettük ki. A próba jelöléséhez minden esetben digoxigenin jelölést alkalmaztunk (PCR DIG Probe Synthesis Kit, Roche). A lazac sperma DNS-t és a jelölt próbát minden esetben 10 percig 100 °C-os, majd 10 percig 4 °C-os inkubációval denaturáltuk.

A hibridizálást követően a membránt szobahőmérsékleten kétszer 5 percig 2x SSC, 0,1% SDS oldattal, majd kétszer 15 percig 65 °C-on 0,1x SSC, 0,1% SDS oldattal mostuk. Ezt követően 1. detektáló pufferrel 1 percig, majd 2. detektáló pufferrel 30 percig, majd a 2. detektáló pufferhez adott 4 µl alkalikus foszfátáz antitest-konjugátummal (Anti-Digoxigenin-AP, Roche) újabb 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően kétszer 15 perces mosás következett 1. detektáló pufferrel, majd 2-5 perces mosás 3.

detektáló pufferrel. A detektálást a 3. detektáló pufferhez adott 200 µl NBT-BCIP (DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche) előhívó reagenssel végeztük, sötétben történő 1-2 órás inkubációval. Végül a felesleges festéket desztillált vízzel lemostuk a membránról.

5.7.10. A feltételezett HMG-KoA reduktáz szekvenciák analíziséhez használt szoftverek

A feltételezett HmgR fehérjék szekvenciájának elemzéséhez a Swiss Expasy Server (<http://www.expasy.ch>) programjait használtuk. A molekulatömeg és az izoelektromos pont (pI) meghatározásához a ProtParam (Gasteiger és mtsi. 2005), a transzmembrán domének kereséséhez pedig a HMMTOP (Tusnády és Simon 2001) és TMPred (Hofmann és Stoffel 1993) programokat használtuk. A fehérjékben található motívumok és domének keresését a Motif Scan (MyHits) program (Pagni és mtsi. 2007) segítségével végeztük. A szekvenciák elemzése során a szoftverek alap beállításait használtuk.

5.7.11. Kompetens *E. coli* sejtek készítése

E. coli TOP10F⁺ 16 órán át nevelt tenyészet 1 ml-ét 30 ml LB tápoldatba átvéve, a baktériumokat OD₆₀₀=0,5 érték eléréséig 37 °C-on, 200 rpm rázatás mellett növesztettük. A tenyészetet centrifugáltuk (2162 g, 10 perc, 4 °C), majd a sejteket, az átvett tenyészettel 1-1 arányban, hideg 100 mM-os CaCl₂ oldatban felfuszpendáltuk. Centrifugálást (2162 g, 10 perc, 4 °C) követően a lépést megismételtük, majd 1 órán át tartó jeges vízfürdőben történő inkubációt követően ismét centrifugáltuk a sejteket (2162 g, 10 perc, 4 °C). A kiülepedett sejteket 1/20 térfogatú hideg, 20% glicerinnel tartalmú 100 mM CaCl₂ oldatban felfuszpendáltuk. A kompetens sejteket 100 µl mennyiségekbe szétadagoltuk, ezeket a későbbi felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

5.7.12. Baktérium transzformáció

100 µl fagyaszttva tárolt kompetens sejtet jégen felolvasztottunk, majd 15-25 µl ligátumot és 100 µl TCM puffert adtunk hozzá és a baktériumokat 30 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően 1 perc 30 másodpercre 42 °C-ra helyeztük, majd 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A baktériumokat végül ampicillin tartalmú (100 µg/ml) LB táptalajra szétadagoltuk. A Petri-csészéket 16 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk.

5.7.13. Protoplasztképzés

A *M. circinelloides* protoplasztok képzéséhez a sejtek előkészítését celofánon történő előneveléssel végeztük el. Az MS12 törzs YNB táptalajon, 4-5 napon keresztül, fényben nevelt tenyészetéről steril desztillált vízzel lemostuk a sporangiospórákat, majd a tömény spóraszuszpenzióból oltótúvel friss, celofánkoronggal fedett YEG táptalajra oltottunk. A tenyészeteket 25 °C-on, 16 órán keresztül neveltük. 16 óra elteltével a micéliumkorongokat protoplasztáló oldatba helyeztük, majd 3 órán át, szobahőmérsékleten, 50 rpm rázatással elősegítettük a képződő protoplasztok leválását. A sejtfal oldásához saját készítésű, éticsiga (*Helix pomatia*) gyomorból preparált lítikus emésztőenzimet használtunk. SMC pufferrel alaposan átmosva a micéliumkorongokat a protoplasztokat tölcsérbe helyezett gézen keresztül sterilen átszűrtük, így megszabadultunk a micéliumtörmeléktől. A centrifugálással (2162 g, 10 perc, 4 °C) összegyűjtött protoplasztokat 5 ml SMC pufferrel mostuk, majd újabb centrifugálás után 250 µl SMC pufferbe vettük fel.

5.7.14. A protoplasztok transzformációja

Az általunk alkalmazott módszer a van Heeswijck és Roncero (1984) által leírt PEG-mediált transzformáció módosítása. A 250 µl SMC pufferbe felvett protoplasztokhoz 5-10 µg plazmidot és 20 µl PMC puffert adtunk, a protoplasztok és a transzformáló DNS összeapásával elősegítve a transzformációt. Ezután a mintákat fél órán keresztül jégen inkubáltuk. További 2,5 ml PMC puffer hozzáadása után a mintákat 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A mintákat 20 ml SMC pufferrel hígítva centrifugáltuk. A protoplasztok regenerációjának elősegítéséhez a kiüledett sejtekhez szorbitolt tartalmazó YPG tápoldatot adtunk, majd fél órán át 25 °C-on inkubáltuk őket. Centrifugálás után SMC pufferrel mostuk a sejteket, majd a kiülepített sejteket kis mennyiségű (100-200 µl) SMC-ben szuszpendáltuk és szorbitollal kiegészített YNB fedőagarral összekeverve szorbitolt tartalmazó YNB csészékre öntöttük. A dolgozatban szereplő vektorkonstrukciók *pyrG* gént hordoznak szelekciós markerként, ezért a táptalajokat leucinnal egészítettük ki. A csészéket 4-10 napig, a transzformáns telepek megjelenéséig szobahőmérsékleten inkubáltuk.

5.7.15. Karotinkivonás

A *M. circinelloides* MS12 törzsét és a transzformánsokat YNB csészéken 4 napig, állandó megvilágítás mellett tenyésztettük. A micéliumokat csipesz segítségével leszedtük a táptalaj felszínéről, majd a micéliumot dörzsmozsárban folyékony nitrogénnel elporítottuk.

A karotinoidok fényérzékenysége miatt a teljes folyamatot sötétben végeztük. A karotinoidok extrahálásához 400-500 mg micéliumport használtunk, ehhez 500 µl acetont adtunk és erősen vortexeltük néhány percig. A mintákat centrifugáltuk (1.000 g, 1 perc), majd a felülúszót egy új csőbe vittük át. Az extrahálást addig ismételtük, amíg a sejttörmelék teljesen szintelen nem lett (6-10 extrakciós lépés). Az extraktumhoz ezután azonos mennyiségű petrolétert (40-70 °C), valamint a fázisok könnyebb szétválása érdekében 1 ml desztillált vizet adtunk. A szerves fázist centrifugálás után új csőbe pipettáztuk át, majd a petrolétert nitrogéngáz áramoltatása mellett elpárologtattuk. A beszárított karotinoid mintákat -20 °C-on tároltuk.

5.7.16. A karotinoid kivonatok elemzése.

A teljes karotinoid tartalom meghatározásához spektrofotometriás mérést alkalmaztunk. A beszárított, különböző pigmenteket tartalmazó mintákat petroléterben oldottuk, majd 450 nm hullámhosszon határoztuk meg az extinkció értékeket. Extinkciós koefficiensként 2500-al számoltunk (Rodriguez-Amaya 2001).

5.7.17. Ergoszterinkivonás

Az ergoszterin kivonáshoz Alcazar-Fuoli és munkatársai által (2008) leírt módszer módosított változatát használtuk. A micélium begyűjtését követően, a mintákat 85 °C-on szárítottuk egy éjszakán keresztül. A szárítást követően 0,05-0,1 g micéliumot 15 ml polipropilén csőben porrá zúztunk, majd 3 ml 25%-os alkoholos KOH-oldatot mértünk a mintákra. 1 órás 85 °C-os inkubálást követően a mintákhoz 1 ml vizet és 3 ml hexánt adtunk, majd 3 perc erőteljes vortexelés követően a mintákat 1000 g, 10 percig centrifugáltuk. A centrifugálás után a felső fázist új csőbe vittük át és állandó nitrogéngáz áramoltatása mellett beszárítottuk.

5.7.18. Ergoszterinkivonatok elemzése

Az ergoszterinminták analíziséhez nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát (HPLC) használtunk, melyhez egy moduláris Shimadzu rendszert alkalmaztunk egy kétcsatornás UV/VIS detektorral felszerelve. A szárított ergoszterin mintákat 1 ml metanolba oldottuk, melyből 50 µl-t injektáltunk egy Prodigy C18 (4,6x250 mm, ODS 5 µm) oszlopra (Phenomenex). Izokratikus elválasztást végeztünk H₂O/metanol (2:98 v/v) mozgó fázis alkalmazásával és 1,2 ml/perces áramlási sebességgel. A detektálás

hullámhossza 210 és 280 nm volt. Az ergoszterin azonosításához gyári standardot (Sigma) használtunk.

5.7.19. A sztatinek minimális gátló koncentrációjának (MIC érték) meghatározása

A kísérletek során fluvasztatint (Lescol, Novartis), rozuvasztatint (Crestor, Astra Zeneca) és atorvasztatint (Atoris, Krka) használtunk, melyekből a törzsoldatokat mindig frissen készítettük. A tenyésztés 96 lyukú mikrotiter lemezen (Costar 3599) történt YNB tápoldat (leucinnal és/vagy uracillal kiegészítve) felhasználásával.

A fluvasztatin törzsoldat készítéséhez 40 mg hatóanyagot 1 ml metanolban oldottunk fel, majd ezt tovább hígítottuk és az így kapott 2,5 mg/ml koncentrációjú fluvasztatin törzsoldatot használtuk. A rozuvasztatin esetében 20 mg hatóanyagot 1 ml metanolban, az atorvasztatin esetében pedig 10 mg hatóanyagot 0,5 ml metanolban oldottuk fel. A kapott oldatokat tovább hígítottuk 5 mg/ml koncentrációjú sztatinek törzsoldatokká. A sztatinek törzsoldatokból felező hígítási sort készítettünk 11 hígítási lépcsőben metanollal, majd a hígítást 50-szeresére hígítottuk YNB tápoldattal. A spóraszuszpenzió készítéséhez 4 napon keresztül nevelt tenyészetekről steril desztillált vízzel mostuk le a spórákat, majd a tápoldattal 10^5 spóra/ml töménységre állítottuk be a spóraszuszpenziót, amiből 100 μ l-t mértünk a lyukakba. A mikrotiter lemezekre lyukanként 100 μ l 50-szeresre hígított sztatinek oldatot mértünk úgy hogy a fluvasztatin esetében a hatóanyag végkoncentrációja 128-0,25 μ g/ml, az atorvasztatin és a rozuvasztatin esetében pedig 256-0,5 μ g/ml koncentráció tartományban legyen felező hígításban.

A kísérlet során több kontrollt is használtunk. A növekedési kontroll 100 μ l YNB tápoldat és 100 μ l spóraszuszpenzió, az oldószerkontroll 100 μ l 1% metanolt tartalmazó YNB tápoldat és 100 μ l spóraszuszpenzió volt. Háttérkontrollként 200 μ l YNB tápoldatot alkalmaztunk. A mikrotiter lemezeket 3 napig 28 °C-on, állandó hőmérsékleten tenyésztettük és 24, 48 valamint 72 óra elteltével 620 nm-en a tenyészet optikai denzitását lemértük egy Jupiter HD plate leolvasó segítségével (ASYS Hitech GmbH). Minden mérést 3 párhuzamosban végeztünk. Az átlagolás illetve a háttérabszorbancia levonása után a sztatinek gátlásának kiszámítását a növekedési kontrollhoz (100%) viszonyítva adtuk meg.

5.7.20. Mikroszkópos vizsgálatok

A fény- és fluorescens mikroszkópos megfigyelésekhez AxioCam ERc 5s kamerával (Carl Zeiss) AxioLab (Carl Zeiss) felszerelt fluoreszcens mikroszkópot használtunk, a

felvételek készítését és kiértékelését ZEN 2011 szoftver (Carl Zeiss) segítségével végeztük. A propidium jodid festés során szűrőként filter szet 15-öt (excitáció BP 546/12 nm, emisszió LP 590 nm; Carl Zeiss) alkalmaztunk. Az annexin V – FITC festés során, valamint a GFP fúziós fehérje sejten belüli lokalizációjának vizsgálatához filter szet 9-t (excitáció BP 450-490 nm, emisszió LP 515; Carl Zeiss) használtunk.

A konfokális mikroszkópos megfigyeléseket FluoView FV1000 (Olympus) típusú konfokális mikroszkóppal végeztük, melyhez FV10-ASW (Olympus) szoftvert alkalmaztunk. A GFP fúziós fehérjék sejten belüli lokalizációjának a megfigyeléséhez 488 nm excitációs és 510 nm emissziós szűrőt használtunk, míg az ER-Tracker Red és MitoTracker Red festést követően 543 nm excitációs és 603 nm emissziós értékkel bíró szűrőt alkalmaztunk.

5.7.21. Membránfrakció izolálás

A membrán izoláláshoz a törzseket YNB táptalajon tenyésztettük 2 napon keresztül, majd a táptalaj felszínéről csipesz segítségével leszedtük a micéliumot. Ezt folyékony nitrogén segítségével porrá törtük, majd 4 g elporított micéliumhoz 8 ml homogenizáló puffert mértünk. A mintát kémcsőkeverő segítségével homogenizáltuk, majd 10 percig jégen inkubáltuk. Az inkubálás után a mintát 500 g fordulatszámon, 15 percig centrifugáltuk. A centrifugálást követően a felső fázist ultracentrifuga csőbe vittük át és 100.000 g-vel, 1 órán keresztül centrifugáltuk. A felső fázis tartalmazta a szolubilis fehérjéket, míg a pellet a membrán frakciót.

5.7.22. A membránfrakció fluoreszcenciájának vizsgálata

Az ultracentrifugálást követően a membránfrakciót 1 ml homogenizáló pufferbe oldottuk. A membránfrakció fluoreszcenciáját először fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss Axiolab) közvetlenül vizsgáltuk, majd fluoriméterrel is meghatároztuk. Utóbbi során, 100 µl mintát fekete 96 lyukú mikrotiter lemezre (Greiner Bio One) vittünk át, majd azt FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech) készülék segítségével vizsgáltuk. Excitációs filternek 485 BP-t, emissziós filternek 500-10-t használtunk. Háttérkontrollként a homogenizáló puffert alkalmaztuk.

5.7.23. Statisztikai elemzések

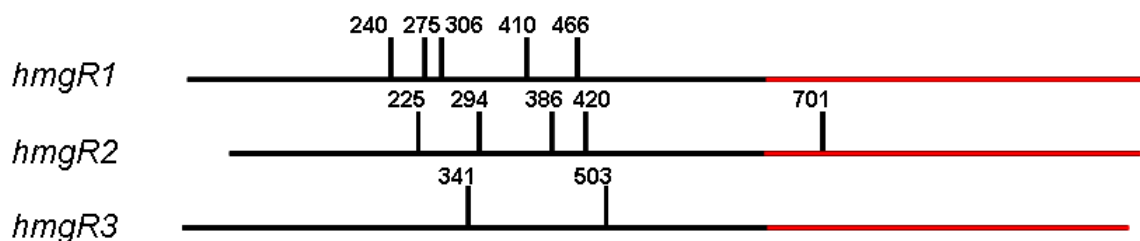
Az adatok kiértékelését, az átlagok és szórások, valamint a különbségek szignifikanciájának kiszámítását Microsoft Excel program segítségével végeztük, utóbbi esetben párosított vagy párosítatlan t-próbát alkalmaztunk.

6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

6.1. A *Mucor circinelloides* 3-hidroxi-3-metilglutaril koenzim A reduktáz génjeinek izolálása és a gének elemzése

A *M. circinelloides* teljes genomjának meghatározása 2010-ben fejeződött be (<http://genome.jgi-psf.org/Mucci2/Mucci2.home.html>), ami nagymértékben elősegítette az egyes bioszintézis utakban szerepet játszó gének keresését és azonosítását. Munkánk elején a *P. blakesleeanus* (X58371, Ruiz-Albert és mtsi. 2002) és a laborunkban korábban azonosított *R. miehei* (AJ568024, Lukács és mtsi. 2009) *hmgR* génjeivel kerestünk homológ szekvenciákat a *Mucor* adatbázisban. Három olyan feltételezett gént találtunk (*hmgR1* - scaffold_02: 2759562-2763160; *hmgR2* - scaffold_03: 4299175-4302130 és *hmgR3* - scaffold_04: 4237143-424075), amelyek nagyfokú hasonlóságot mutattak a *Phycomyces* és *Rhizomucor hmgR* génekkel.

A kapott szekvenciákra alapozva specifikus indítoszekvenciákat terveztünk (1. táblázat), melyek segítségével mind három gént (*hmgR1*, *hmgR2* és *hmgR3*) az őket határoló régiókkal együtt és a megfelelő cDNS-eket sikerült felszaporítani (1. melléklet). A meghatározott nukleotid szekvenciákat az NCBI GenBank adatbázisba depozitáltuk. A *hmgR1* (GenBank azonosító: KJ508882.1) kódoló szakasza 3740 bp hosszúságú, melyben a cDNS szekvencia meghatározásával öt intront azonosítottunk (54, 82, 74, 58 és 55 bp hosszúságúak). A *hmgR2* gén (GenBank azonosító: KJ508884.1) 3595 bp hosszú és szintén öt intront tartalmaz (59, 53, 79, 124 és 58 bp hosszúságúak), míg a *hmgR3* (GenBank azonosító: KJ508883.1) esetében egy 3491 bp hosszúságú kódoló régiót azonosítottunk két darab intronnal (65 és 81 bp hosszúságúak). Az intronok mindegyike tartalmazza az 5' végén a GT, 3' végén pedig az AG motívumokat. A *hmgR1* és *hmgR2* esetében a stop kodont a TAA, míg a *hmgR3* esetében a TAG triplet kódolja.



6. ábra. A *M. circinelloides hmgR* génjeiben található intronok elhelyezkedése.

A kódolt fehérjeszekvenciákat jelképező vonalak hossza arányos a fehérjeszekvenciák hosszával, egymáshoz viszonyított helyzetük, a pirossal jelölt, C-terminális régióik konzervált fehérjeszakaszainak egymás alá rendezéséből következik. A számok a fehérjeszekvenciáknak azt az aminosavát jelölik, amelynek kodonja után a génben az intron elhelyezkedik.

A 6. ábrán látható, hogy *hmgR2* esetében azonosítottunk egy olyan intron szakaszt, mely a fehérje katalitikus aktivitásáért felelős régiójában helyezkedik el. A járomspórás gombák közül a *R. miehei* *hmgR* gén 5 (Lukács és mtsi. 2009), míg a *P. blakesleeanus* *hmgR* gén 4 intron tartalmaz (Ruiz-Albert és mtsi. 2002). Lukács és munkatársai (2009) a *R. miehei* és a *P. blakesleeanus* *hmgR* gének intron pozícióinak összehasonlításakor, arra a megállapításra jutottak, hogy a *Rhizomucor* *hmgR* utolsó 4 intronja azonos pozícióban helyezkedik el a *Phycomyces* *hmgR* intronjaival. Ez arra utal, hogy a *hmgR* génekben az intronok pozíciója valamilyen szinten konzervált. Azonban a *M. circinelloides* *hmgR* génjeiben található intron pozíciók, a *Rhizomucor* és *Phycomyces* intron pozícióival történő összevetésekor nem állapíthattunk meg ilyen egyértelmű konzerváltságot. Ahogy a három gén esetében is látható, az intronok mennyisége és elhelyezkedése igen variábilis. A *S. cerevisiae*, *Sch. pombe*, *C. glabrata* és *C. albicans* *hmgR* génjei ezzel szemben nem tartalmaznak intronokat (Andrade-Pavón és mtsi. 2013).

6.2. A *M. circinelloides* HMG-KoA reduktázainak jellemzése

A PCR reakció során felszaporított feltételezett *hmgR* gének cDNS-ének szekvenálása után megállapítottuk a fehérjék feltételezett aminosav sorrendjét. A feltételezett fehérjék főbb tulajdonságait a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat. A *M. circinelloides* HMG-KoA reduktázok főbb tulajdonságai.

	HmgR1	HmgR2	HmgR3
Hossz (aminosav)	1138	1073	1114
Számolt molekula tömeg	124,52 kDa	118,32 kDa	120,71 kDa
Számolt pI	9,11	8,49	8,43
Transzmembrán hélixek száma	6	9	5
Szterol-érzékelő domén	244-403 as	231-379 as	279-439 as
HMG-kötő motívum	CENVIGYMPIP (749-759 as) PMATTEGCLVA (776-786 as)	CENVIGYMPIP (687-697 as) PMATTEGCLVA (714-724 as)	CENVIGYMPIP (756-766 as) PMATTEGCLIA (783-793 as)
NAD(P)H kötő motívum	TGDAMGMN (872-879 as) VGTVGGGT (1022-1029 as)	TGDAMGMN (810-817 as) VGTIGGGT (960-967 as)	TGDAMGMN (879-886 as) VGTIGGGT (1029-1036 as)

A három *hmgR* gén által kódolt, feltételezett HmgR1, HmgR2 és HmgR3 fehérje méretükben, izoelektromos pontjukban és a transzmembrán hélixek számában eltéréseket mutattak.

Az enzimek állatok és gombák esetében 7-8 transzmembrán doménnel rendelkeznek (Basson és mtsi. 1988; Croxen és mtsi. 1994; Olender és Simoni 1992; Roitelman és mtsi. 1992), míg növények esetében ez a szám általában 2 (Genschik és mtsi. 1992; Learned és Fink 1989; Nelson és mtsi. 1994). A *M. circinelloides* HmgR1 esetében 6, a HmgR2 esetében 9, míg a HmgR3 esetében 5 transzmembrán hélixet azonosítottunk. Szíriai aranyhórcsög HMG-KoA reduktáz fehérjéjének esetében azonosítottak egy szignált az első transzmembrán régióban, amely az enzimet az ER-be irányítja (Oleander és Simoni 1992), azonban mi a három vizsgált fehérje aminosav szekvenciájában nem találtunk ehhez hasonló szignálszekvenciát. Az N-terminális régió feltételezett transzmembrán hélixeken kívül tartalmaz egy szterol érzékelésért felelős domént (SSD), mely érzékeli a szterolok mennyiségét a sejten belül (Loftus és mtsi. 1997, Brown és Goldstein 1999, Davies és Ioannou 2006) és szerepet játszik az enzim poszttranszlációs szabályozásában. *S. cerevisiae* Hmg2p esetében Chandra és munkatársai (2011) kimutatták, hogy ez az SSD domén közvetlenül szabályozza az enzim ER-asszociált lebomlását (ERAD), valamint előkészíti az enzimet a degradációs útvonalba való belépéshez.

<i>M. circinelloides</i> HmgR1	MDVIVVTAGVIMMAFFELSLNIRMHK-LGSKYTLATTFMSCFFSFMLSIALTVY-KLCAP
<i>M. circinelloides</i> HmgR2	VDLLLLTSGVVEFMFILLINIEYSLRQVVGSYCIIGSAVILNICALVFGLTAMK-LIHVN
<i>M. circinelloides</i> HmgR3	IDIIIVILGGYMMMLTFVSLYNNMRS-MGSRKTLATAVVNCGFFSFMFALLTVN-ALGVD
<i>R. miehei</i>	VDIIIVILAGYIMMIATFVSLYNNMRR-MGSRKTLATAVTNCLFSFMLALLTVH-ALGVE
<i>P. blakesleeanus</i>	IDIIIVILVGYIMMIATFISLYNNMRA-MGSRKTLATAVVNCGFFSFMFALLTVR-ALGVD
<i>Sch. pombe</i>	TELLIVGTATACMLHSIVSLYIKMRR-LGSKFWLFFSMLLSTLFSVQFAMTLVR-PSGVR
<i>S. cerevisiae</i> Hmg1p	FDVLIMVTALMMFYITFGLENDMRK-TGSNEWLSASTVVNSASSLALAYVTQCILGKE
<i>S. cerevisiae</i> Hmg2p	FDLFIILAAVLTIFYILCCLENDMRK-TGSKFWLSFALSASACALYLSLYTHSLKKP
<i>M. circinelloides</i> HmgR1	VSPVLLSEATPFLVVTIGFERPYKLTKEIFE-QESNN-TDNSNVLCIISRSVEMMAPTLI
<i>M. circinelloides</i> HmgR2	ITPALLLESPLFLVTIGEGHKKYTKSILS-NTNNN-----NDNSVEMMLA
<i>M. circinelloides</i> HmgR3	VYPVVLAEAIPLAVTIGFERHFKLTKRVFE-FSKETPLTKQEIIRKTTVRAVDSVALPIA
<i>R. miehei</i>	BSPVVLAEAIPLVVTIGFERPYKLTKEIFE-QESNN-TDNSNVLCIISRSVEMMAPTLI
<i>P. blakesleeanus</i>	VYPVVLAEAIPLAVTIGFERPFKLTKRVFE-FSKETPLTKQEIIRKTTVRAVDSVALPIA
<i>Sch. pombe</i>	ISLVSLIIESLPFLINVTALDKAAELTQVIT--RCSVSDSHSPMHEDIAKCRNAPPIIL
<i>S. cerevisiae</i> Hmg1p	VSALTIFEGLPFIVVVSFKHKIRIAQYALEKTERVGLSKRITTDDEIVFESVSEEGGRLL
<i>S. cerevisiae</i> Hmg2p	ASLLSVVIGLPFIVVTIGFKHKVRFAAFSLQKEHRISIDKKTIVSNITYEAMFQEGAYLI
<i>M. circinelloides</i> HmgR1	RDGLLEIVVILGAKST--LPGLREFCLMSAFLIAYDMMIMFTWYIS
<i>M. circinelloides</i> HmgR2	WDCFTEITICLGAKS--SGLREFCWLSACLLAFDFVILCTWYTA
<i>M. circinelloides</i> HmgR3	RDCIMEITVIALGAKSG--SGLREFCLLSAILLAYDFIIMFTWYTA
<i>R. miehei</i>	RDCVIEIMVILGAKSA--TVGLREFCVLSAFLIAYDVVLEFTWYTA
<i>P. blakesleeanus</i>	RDCFMEIIVVILGAKSG--SGLREFCLLSAILLAYDFIIMFTWYTA
<i>Sch. pombe</i>	RHFSFGIVVLAIFSYCN--FGIKQFELF-PAVMIVDILLFSEFFVA
<i>S. cerevisiae</i> Hmg1p	QDHLICITFATIGCSMYAHOIKTLTNFCILSARILIFELIITPTTFYSA
<i>S. cerevisiae</i> Hmg2p	RDYLFYISSIGCAIYARHLPGLVNFCLISTEMIVFILLISATFYSA

7. ábra. A HMG-KoA reduktázban található szterol érzékelő domének aminosav sorrendjeinek összehasonlítása néhány gombafaj esetében.

A szürke háttér az azonos, míg a fekete háttér a hasonló karakterű aminosavakat jelöli.

Az 7. ábrán látható, hogy a *Mucor* HmgR2 szterol érzékelő doménjében egy 13 aminosavnyi hiány található. Emiatt az aminosav hiány miatt, feltehetőleg eltérő lehet az enzim szterol érzékelő képessége és a poszt-transzlációs szabályozása.

Az HMG-KoA reduktáz C-terminális része igen erősen konzervált. Mind három fehérjében megtalálható a HMG-kötésért felelős CENVIGYMPIP és PMATTEGCLVA motívum (Istvan és mtsi. 2000) valamint a NAD(P)H kötődésért felelős TGDAMGMN és VGTVGGGT motívum (3. táblázat). A 8. ábrán néhány gombafaj HMG-KoA reduktáz katalitikus aktivitásért felelős régiójának összehasonlítása látható.

<i>M. circinelloides</i> HmgR1	LADEEIVLLVOHAHTFPYALEKVLGDLERAVHIRKTVISRSSITQTLLESSALFVAEYDYD
<i>M. circinelloides</i> HmgR2	LTDEEIVSVYOSGKMFAYALEKVLGDFERAVHIRRAIVSRDSITKSLGSLLEVKNYHYD
<i>M. circinelloides</i> HmgR3	LSDEEIVMLVQKGMASYALEKVLGDLERAVSIRRAIVSRASITKTLESSLLELHNYHYD
<i>R. miehei</i>	LNDEEIVQLVNAKTIASALEKMLGDMORAVSIRRALISRASVTRTLETSLLEPKDYHYE
<i>P. blakesleeanus</i>	LNDEEIVISLVENGKMFASYALEKVLGDLQRAVGIRRALISRASITKTLEASALELHNYHYD
<i>Sch. pombe</i>	LNDEEIVQLTLAKKIPLYALEKVLKQVTRAVVIRRTVVSRSRTKTLESSNCEVYHYDYD
<i>S. cerevisiae</i> Hmg1p	LKNKEVAALVIHGKIPLYALEKVLGDTTTRAVVRRKALSITAEAPVILASDRLPYKKNYDYD
<i>S. cerevisiae</i> Hmg2p	MNTEVSNLVVNGKIPLYSLKLEKLETTTRAVLVRRKALSTLAESPITVSEKLEFRNYDYD

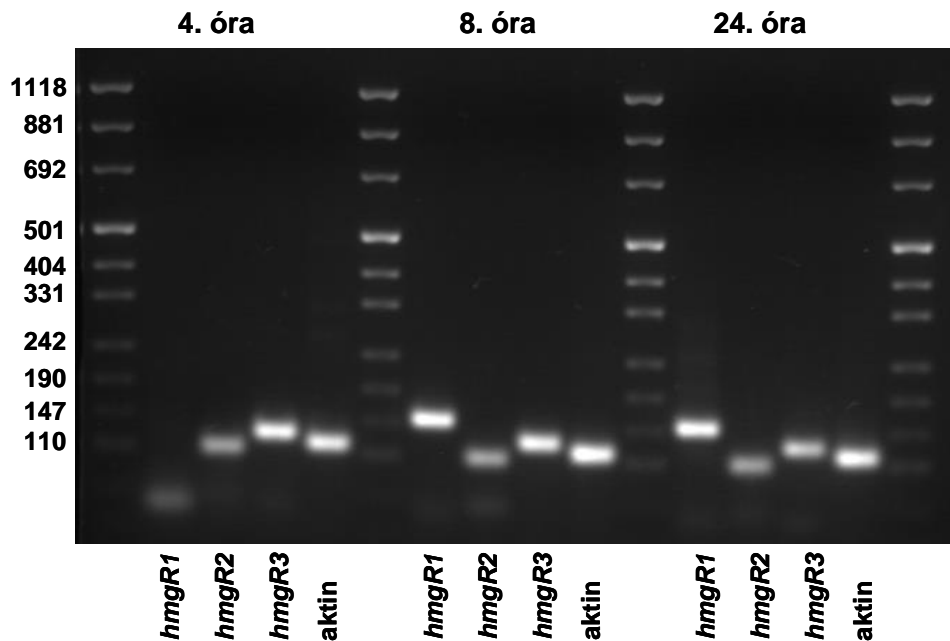
<i>M. circinelloides</i> HmgR1	KVLGACCENVIGYMPIPVGAGPLNIDGDLHIIPMATTEGCLVASFARGCKAVNVNC--AT
<i>M. circinelloides</i> HmgR2	KVMGACCENVIGYMPIPVGAGPLNIDGDLHIIPMATTEGCLVASFARGCKAINAGGGAT
<i>M. circinelloides</i> HmgR3	KVMGACCENVIGYMPIPVGAGPLNIDGDLHIIPMATTEGCLVASFARGCKAINAGGGAT
<i>R. miehei</i>	KVFGACCENVIGYMPIPVGAGPLNIDGIPTHIPMATTEGCLVASFARGCKAINAGGGAT
<i>P. blakesleeanus</i>	KVMGACCENVIGYMPIPVGAGPLNIDGDLHIIPMATTEGCLVASFARGCKAINAGGGAS
<i>Sch. pombe</i>	RVLNACCENVIGYMPIPVGAGPLIIDGKPFYIPMATTEGCLVASFARGCKAINAGGAV
<i>S. cerevisiae</i> Hmg1p	RVFGACCENVIGYMPIPVGVIPLVIDGTSYHIIPMATTEGCLVASFARGCKAINAGGGAT
<i>S. cerevisiae</i> Hmg2p	RVFGACCENVIGYMPIPVGVIPLIIDGTSYHIIPMATTEGCLVASFARGCKAINAGGGAT

<i>M. circinelloides</i> HmgR1	TVLTISDGMTRGPCVEFPNTIDAGLCHRWLDQEGFTIVAEAFNSTSRFARVRKMQVAMAG
<i>M. circinelloides</i> HmgR2	TIVTADGMTRGPCVEFPDILRAADCHRWIEQEGKVVTEAFNSTSRFARVRKLKVALAG
<i>M. circinelloides</i> HmgR3	TIITADGMTRGPCVEFPNTIGAAACKFIEED--CATIITAFAFNSTSRFARLRKLKVALAG
<i>R. miehei</i>	TIVTADGMTRGPCVEFPNTIRAGECHRWIENE--GYTVLADAFNATSRFARLRKLKVTLAG
<i>P. blakesleeanus</i>	TIVTADGMTRGPCVEFPNTIRAAACKLWIENE--GNDIVTNAFNSTSRFARLRKLKVALAG
<i>Sch. pombe</i>	TVLTIRQMSRGPCVAFEDLTRAGRAKIWLDSPEGQVMMKKAFNSTSRFARIQHIKTALAG
<i>S. cerevisiae</i> Hmg1p	TVLTIRKQMSRGPCVVRFPETLKSGGACKIWLDSSEEGQNAKKAFNSTSRFARIQHIQTCLAG
<i>S. cerevisiae</i> Hmg2p	TVLTIRKQMSRGPCVVRFPETLIRSGGACKIWLDSSEEGQNSIKKAFNSTSRFARIQHIQTCLAG

<i>M. circinelloides</i> HmgR1	KLIVYIRFSTTIGDAMGMNMISKGCEKALSIAEYF--PTMQIVSLSGNYCTDKKPAAINW
<i>M. circinelloides</i> HmgR2	RLMYIRFSTTIGDAMGMNMISKGCEKALSIAERY--PDMQIISLSGNYCTDKKPAAINW
<i>M. circinelloides</i> HmgR3	RLVYIRFSTTIGDAMGMNMISKGCEKALSIVLSEHF--PDMQIVSLSGNYCTDKKPAAINW
<i>R. miehei</i>	KLIVYIRFSTTIGDDMGGMNMISKGCEALSIVLSEHF--PDMQIISLSGNYCTDKKPAVINW
<i>P. blakesleeanus</i>	KLIVYIRFSTTIGDAMGMNMISKGCEKALSITTEHF--PDMQIISLSGNYCTDKKPAAINW
<i>Sch. pombe</i>	TRLFIRFCTSTGDAMGMNMISKGVEHALVMSNDAGFDDMOVIVSVGNYCTDKKPAAINW
<i>S. cerevisiae</i> Hmg1p	DLLFMRFRITIGDAMGMNMISKGVEYSLKQMVVEYGWEDMEVVSVSGNYCTDKKPAAINW
<i>S. cerevisiae</i> Hmg2p	DLLFMRFRITIGDAMGMNMISKGVEYSLKQMVVEYGWEDMEVVSVSGNYCTDKKPAAINW

<i>M. circinelloides</i> HmgR1	IEGRGKSVVAEAVIPGAVVEKVLKTTVAALVELNISKNLIGSAMAGSVGGFNAAHANILT
<i>M. circinelloides</i> HmgR2	IEGRGKSVVAEAVIPGAVVEKVLKTTVAALVELNISKNLIGSAMAGSVGGFNAAHANILT
<i>M. circinelloides</i> HmgR3	IEGRGKSVVAEAVIPGAVVEKVLKTTVAALVELNISKNLIGSAMAGSVGGFNAAHANILT
<i>R. miehei</i>	IEGRGKSVVAEAVIPGAVVEKVLKTTVAALVELNISKNLIGSAMAGSVGGFNAAHANILT
<i>P. blakesleeanus</i>	IEGRGKSVVAEAVIPGAVVEKVLKTTVAALVELNISKNLIGSAMAGSVGGFNAAHANILT
<i>Sch. pombe</i>	IDGRGKSVVAEAVIPGDAVKSVLKTTVEDLVKLVNDKNLIGSAMAGSVGGFNAAHANIVT
<i>S. cerevisiae</i> Hmg1p	IEGRGKSVVAEAVIPGDVVRKVLKSDVSALVELNISKNLIGSAMAGSVGGFNAAHANLVT
<i>S. cerevisiae</i> Hmg2p	IEGRGKSVVAEAVIPGDVVKSVLKSVDVSALVELNISKNLIGSAMAGSVGGFNAAHANLVT

<i>M. circinelloides</i> HmgR1	AMVITVGGQDPAQNVESNCITLMKSVNNGSALHISCSMPSTEVGTVGGGTILPPQQAAML
<i>M. circinelloides</i> HmgR2	AIYLATGQDPAQNVESNCITLMKAVNNDKDNISCTMPC--TEVGTIGGGTILPPQQAAML
<i>M. circinelloides</i> HmgR3	AVYLATGQDPAQNVESNCITLMKATINNQDLHISCSMPSTEVGTIGGGTILPPQQAAML
<i>R. miehei</i>	AIYLAAGQDPAQNVESNCITLMKAVNDGKDLHISCTMPSHRKIGTVGGGTILPPQQAAML
<i>P. blakesleeanus</i>	AIYLATGQDPAQNVESNCITLMKAVNDTKDLHISCTMPS--TEVGTIGGGTILPPQQAAML
<i>Sch. pombe</i>	AVYLATGQDPAQNVESNCITLMDNVDG--NLQLSVSMPS--TEVGTIGGGTVLEPQGAML
<i>S. cerevisiae</i> Hmg1p	AVFLALGQDPAQNVESNCITLMKEVDG--DIRISVSMPS--TEVGTIGGGTVLEPQGAML
<i>S. cerevisiae</i> Hmg2p	ALFLALGQDPAQNVESNCITLMKEVDG--DIRISVSMPS--TEVGTIGGGTVLEPQGAML

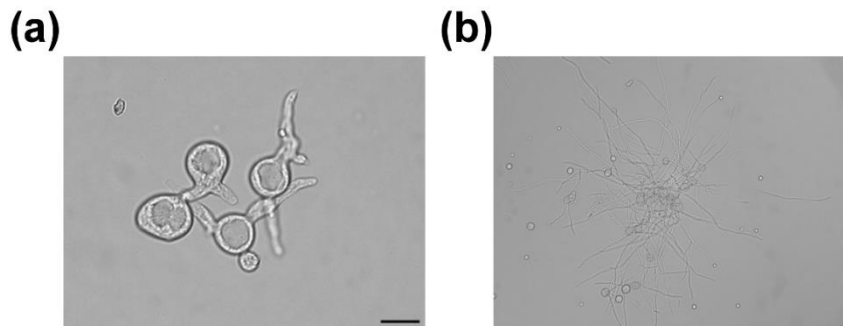


9. ábra. Az RT-PCR eredménye.

DNS markerként pUCMIX markert használtunk (Thermo Scientific). A törzset minimál táptalajon növesztettük 25 °C-on. Az ábra felső részén a spórák leoltásától az RNS kivonásig eltelt időt tüntettük fel.

6.3.1. A *hmgR* gének relatív transzkripciós szintjei a tenyésztési időszak alatt.

Megvizsgáltuk a gének kifejeződését a tenyésztési időszak alatt. A tenyésztést minimál táptalajon 25 °C-on végeztük. A vizsgálatot a spórák leoltásától számított 4. órától a 96. óráig végeztük. A *M. circinelloides* esetében a spórák leoltását követő 4. órában jelennek meg a csíratömlők, a 8. órában már intenzív micéliumképzés figyelhető meg (10. ábra).

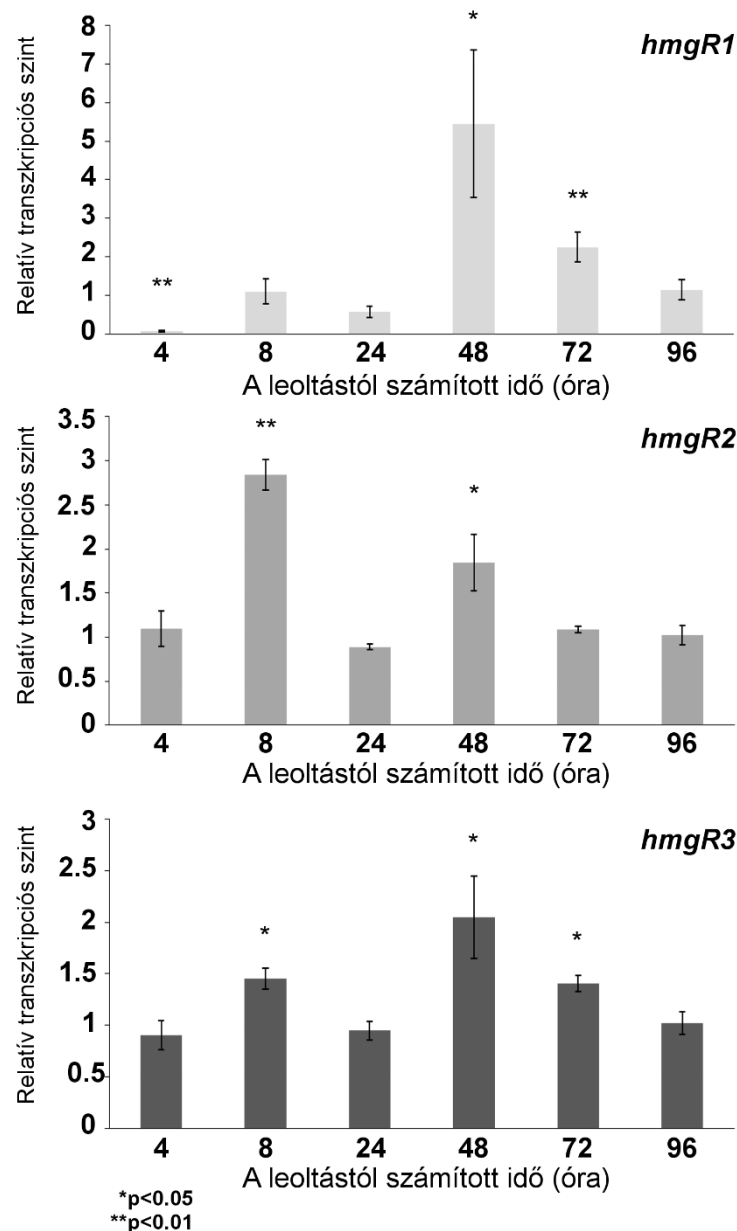


10. ábra. A *M. circinelloides* csírázó spóráinak és fiatal hifáinak morfológiája a leoltástól számított 4. (a) és 8 (b) órában.

A méret skála 10 μm -nek felel meg.

A tenyésztési idő alatt a *hmgR2* és *hmgR3* végig hasonló relatív transzkripciós szinteket mutatott. Mindkét gén magas értéket ért el a leoltástól számított 4. órában, ezzel jelezve, hogy a gének átíródása már a csírázás időpontjában aktív. A *hmgR1* esetében alig

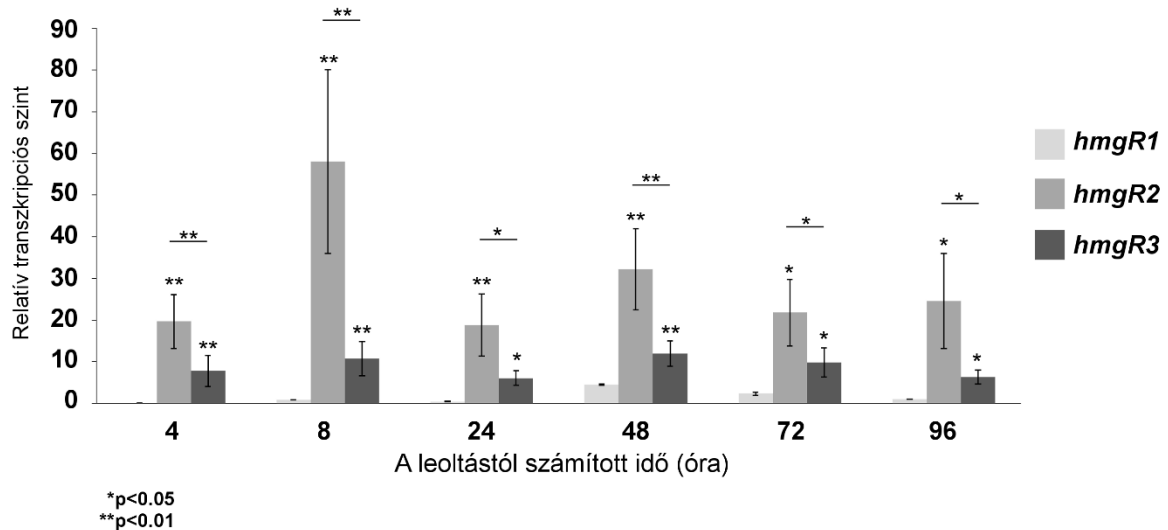
detektáltunk transzkripciót a leoltástól számított 4. órában. A 9. és 11. ábrán jól látszik, hogy a *hmgR1* még nem aktív a spórák csírázásának idején. A *hmgR1* és a *hmgR3* a legmagasabb transzkripciós szintet a leoltástól számított 48. órában érték el, míg ez az érték a *hmgR2* esetében a 8. órában volt mérhető, amikor beindult az intenzív micéliumképzés.



11. ábra A *hmgR* gének relatív transzkripciós szintjei a tenyésztési idő alatt.

Mindegyik gén esetében a 96. órában mért értékhez viszonyítottunk. A diagramon három egymástól független mérés eredményeinek átlagértékeit tüntettük fel szórással együtt, * és ** jelzi a 96. órában mért értéktől való szignifikáns eltérést. A szignifikancia szint megállapításához párosított t-próbát végeztünk.

A 3 *hmgR* gén relatív transzkripciós szintjét egymáshoz hasonlítva, megállapíthatjuk, hogy a tenyésztési időszak alatt végig a *hmgR2* mutatta a legnagyobb transzkripciós szintet, míg a legalacsonyabbat a *hmgR1* (12. ábra).



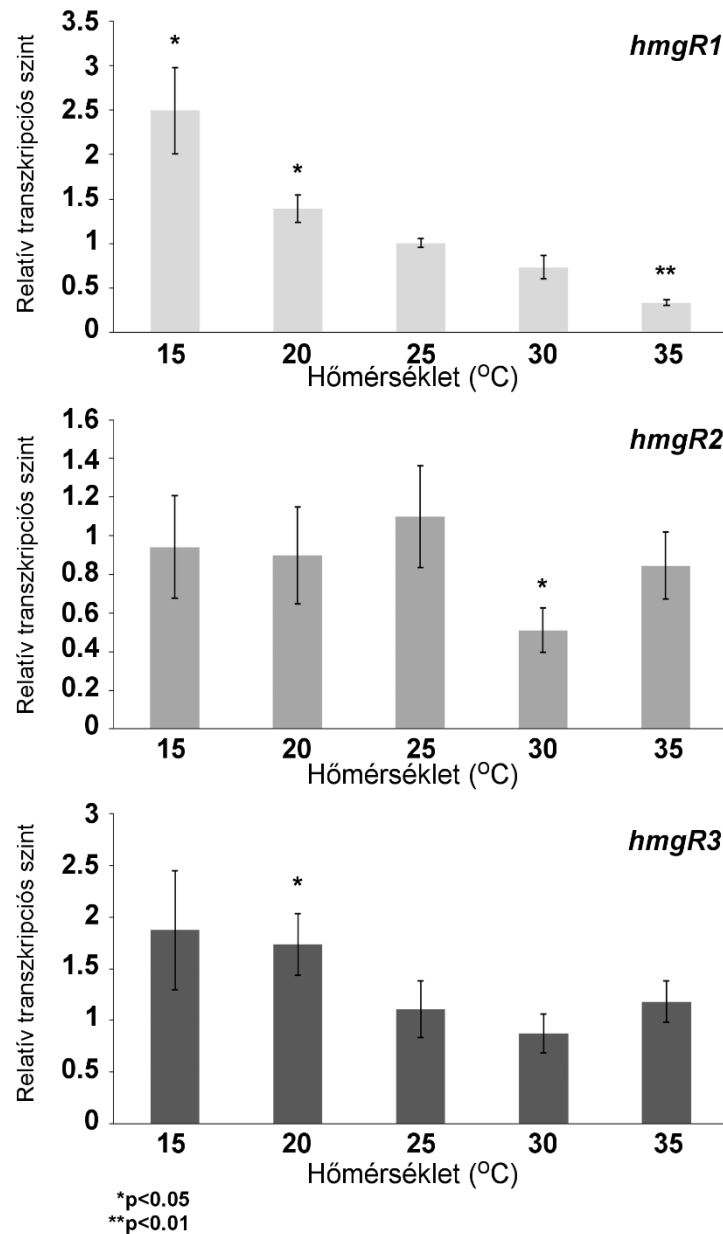
12. ábra. A *M. circinelloides* 3 *hmgR* génjének relatív transzkripció szintje a tenyésztési idő alatt.

Az eredményeket három egymástól független mérés után kaptuk, a szórás jelzi a mérések közötti eltéréseket. A *hmgR1* gén 96. órában mért relatív transzkripció szintjéhez viszonyítottunk. A vízszintes vonalak jelzik a *hmgR2* és *hmgR3* gén relatív transzkripciójának szignifikáns különbségeit, míg az oszlopok feletti csillagok a *hmgR1* génhez viszonyított szignifikáns eltérésekre utalnak. A szignifikancia szint megállapításához párosítatlan t-próbát végeztünk.

A fenti ábrákon látható, hogy a *hmgR2* és a *hmgR3* relatív transzkripció mintázata hasonló egymáshoz és eltér a *hmgR1* esetében mérttől. Az eredmények azt mutatják, hogy a *hmgR1* csak a micéliumban fejeződik ki, és a relatív transzkripció szintjének a maximumát a leoltástól számított második napon éri el. Ezzel szemben a *hmgR2* és *hmgR3* már a csírázó spórákban is aktívak és ez az aktivitás megmarad a fiatal hifákban is. A szakirodalomból ismert, hogy a HMG-KoA reduktáz hatással van a gomba morfogenezisére és polarizált növekedésére (Lukács és mtsi. 2009; Seiler és Plamann 2003; Nickerson és mtsi. 2006), azonban igen kevés információval rendelkezünk a spórák csírázásában és a hifaképzés során betöltött szerepéről. Basson és munkatársai (1986) kimutatták, hogyha deletálják a *S. cerevisiae* Hmg1p vagy Hmg2p génjét, akkor nem történik meg a spórák csírázása és a növekedés. Az eredményeink azt mutatják, hogy a *hmgR2* és *hmgR3*, a *Mucor* esetében, már a spórák csírázásának és az intenzív micélium képzésének idejében fontos szerepet töltenek be. A leoltástól számított 48. órában kezdődik meg a spóratartók és a spórák képzése. Mivel a *hmgR1* átíródása ebben az időben a legmagasabb, lehetséges, hogy valamilyen szerepe lehet a spóráképzésben, azonban a 11. ábrán látható, hogy mindhárom reduktáz gén esetében magas relatív transzkripció szintet mértünk ebben az időpontban.

6.3.2. A *hmgR* gének relatív transzkripció szintjei különböző hőmérsékleten.

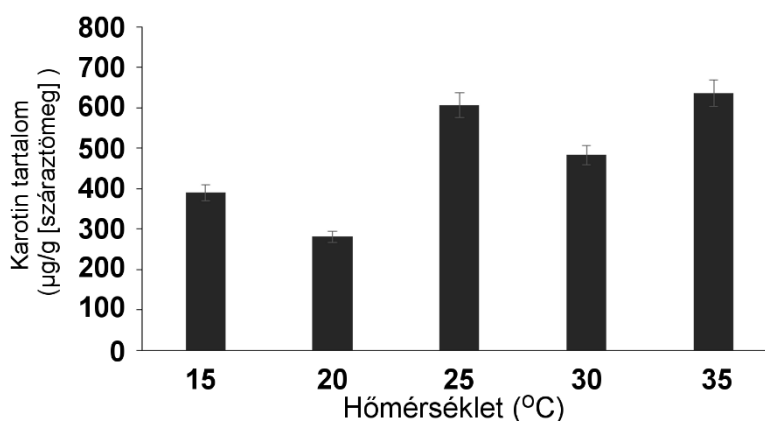
A környezethez való alkalmazkodásban jelentős szerepe van a sejtmembrán szerkezetének és fluiditásának. A gombák sejtmembránjának fő szterin komponense és így a membránszerkezet egyik fontos eleme, az ergoszterin, melynek képződését a HMG-KoA redukáz aktivitása meghatározza. Utóbbi ily módon, közvetve maga is szerepet játszik a környezethez való alkalmazkodásban.



13. ábra. A *hmgR* gének relatív transzkripció szintjei különböző hőmérsékleteken
Mindegyik gén esetében a 25 °C-on mért értékhez viszonyítottunk. A diagramon három egymástól független mérés eredményeinek átlagértékeit tüntettük fel szórással együtt, * jelzi a 25 °C-on mért értéktől való szignifikáns eltérést. A szignifikancia szint megállapításához párosított t-próbát végeztünk.

Gyakorlati szempontból is érdemes megvizsgálni a hőmérséklet hatását a másodlagos metabolitok termelődésére és a bioszintézükben szerepet játszó gének kifejeződésére, ugyanis a különböző élőlények karotinoid termelésére eltérő módon hat a megváltozott hőmérséklet (Bhosale 2004).

Négy napig minimál táptalajon tenyésztve a törzset, megvizsgáltuk a különböző hőmérsékletek hatását az egyes reduktáz gének relatív transzkripciós szintjére nézve (13. ábra). A *hmgR1* esetében az tapasztaltuk, hogy a növekvő hőmérséklettel párhuzamosan a gén relatív transzkripciós szintje szignifikánsan csökkent. Nem tapasztaltunk viszont hőmérsékletfüggést a *hmgR2* és *hmgR3* esetében. A *hmgR2* esetében csak 30 °C-on tapasztaltunk szignifikáns transzkripciós szint csökkenést a 25 °C-hoz képest, míg *hmgR3* esetében transzkripciós szint növekedést tapasztaltunk 20 °C-on. A tenyésztési hőmérséklet nagyban befolyásolja az egyes másodlagos metabolitok termelődését, melyek nem csak a sejtmembrán kialakításában játszanak szerepet. A járomspórás gombák karotinoid termelését nagymértékben befolyásolja a hőmérséklet (Mosqueda-Cano és Gutierrez-Corona 1995; Nagy és mtsi. 2012; Papp és mtsi. 2013). *M. rouxii* esetében az optimális 28 °C-ról 40 °C-ra emelve a hőmérsékletet háromszorosára nőtt a termelődött karotinoid mennyisége (Mosqueda-Cano és Gutierrez-Corona 1995), ezzel szemben *Dunaliella* esetében 34 °C-ról 17 °C-ra csökkentve a hőmérsékletet 7,5-szeresére nőtt karotinoidmennyiség (Orset és Young 1999). Az MS12 törzs karotinoid termelését is nagyban befolyásolja a hőmérséklet. A transzkripciós vizsgálatokhoz felhasznált tenyészet karotinoid tartalmát megvizsgálva (14. ábra) arra a megállapításra jutottunk, hogy 30 °C-on tenyésztve a törzset az termelt karotinoid mennyisége lecsökken a 25 °C-on mért értékhez képest, míg 35 °C-on tenyésztve ismét megnő (Nagy és mtsi. 2012). Hasonló növekedést és csökkenést tapasztaltunk a *hmgR2* gén transzkripciós szintjének mérésekor is.

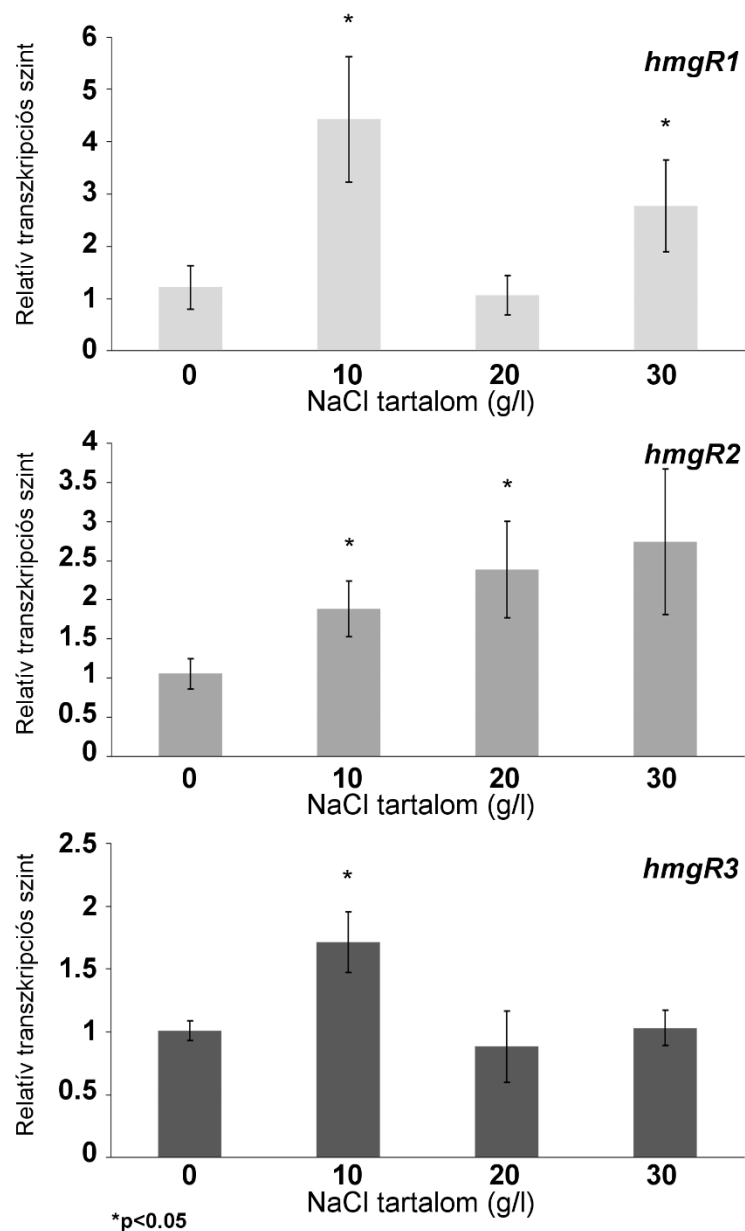


14. ábra. Az MS12 karotinoid tartalma különböző hőmérsékleteken.

Az eredményeket három egymástól független mérés után kaptuk, a szórás jelzi a mérések közötti eltéréseket.

6.3.3. Sóstressz hatása a *Mucor hmgR* génjeinek relatív transzkripciójára

A HMG-KoA reduktáz aktivitása és az enzim sejten belüli szintje esszenciális a halotoleráns fenotípus kialakításához, valamint az ozmotikusan megváltozott környezethez való adaptálódáshoz (Vaupotič és mtsi. 2008; Bidle és mtsi. 2007). *H. werneckii* esetében az enzim lovasztatinnal történő gátlása sószenszitiv fenotípus megjelenését eredményezte (Vaupotič és mtsi. 2008).



15. ábra. A *hmgR* gének relatív transzkripció szintjei sóstressz hatására.

Mindegyik gén esetében a 0 g/l sótartalom mellett mért értékhez viszonyítottunk. A diagramon három egymástól független mérés eredményeinek átlagértékeit tüntettük fel szórással együtt, * jelzi a 0 g/l sótartalom mellett mért értéktől való szignifikáns eltérést. A szignifikancia szint megállapításához párosított t-próbát végeztünk.

Mindezek mellett fontosnak találtuk megvizsgálni a *M. circinelloides* esetében is a sóstressz hatását az egyes *hmgR* gének relatív transzkripciójára (15. ábra). A tenyésztést 25 °C-on különböző koncentrációjú (10, 20 és 30 g/l) NaCl-dal kiegészített minimál táptalajokon végeztük 4 napig. Só jelenlétében mindhárom gén relatív transzkripció szintjében tapasztaltunk változást. *HmgR1* és *hmgR3* esetében a gének relatív transzkripció értékük maximumát 10 g/l só jelenlétében érték el, míg a *hmgR2* esetében a növekvő sókoncentrációval párhuzamosan a relatív transzkripció szint is nőtt. 30 g/l só koncentráció mellett a gomba növekedése már nagymértékben gátolt volt, ezért nem vizsgáltunk magasabb sókoncentráció mellett a gének kifejeződését.

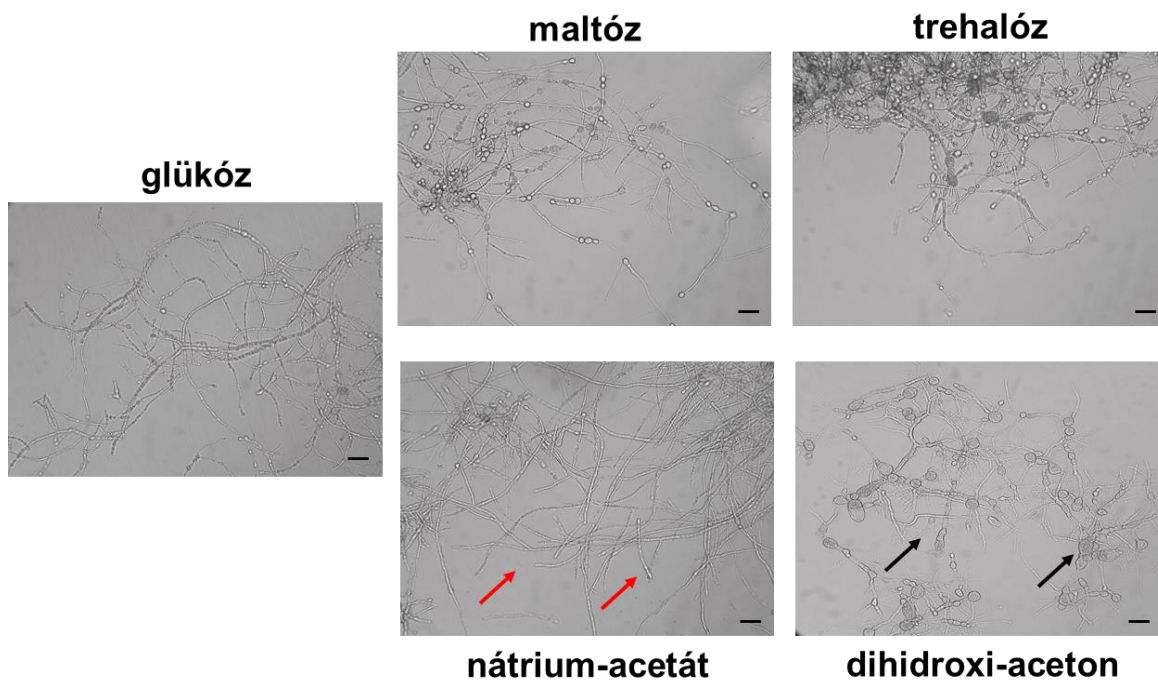
A só szenzitív *S. cerevisiae* és a mérsékelten halotoleráns *Aureobasidium pullulans* fekete élesztő esetében a megnövekedett só koncentráció jelenlétében nőtt a HMG-KoA reduktáz fehérje szintje és annak aktivitása (Vaupotič és mtsi. 2008). *M. circinelloides* esetében is azt tapasztaltuk, hogy a só jelenlétére mindhárom *hmgR* gén reagált, azonban csak a *hmgR2* esetében tapasztaltunk növekvő génkifejeződést a növekvő sókoncentrációval párhuzamosan. A megváltozott környezethez való alkalmazkodáshoz elengedhetetlen a membrán fluiditásának, többek között a szterin összetétel változásán keresztül történő, megváltoztatása. *H. werneckii* halofil élesztőgomba két HMG-KoA reduktáza (HwHMG1 és HwHMG2) a sejten belül eltérő helyen lokalizálódik. A mitokondriális HwHMG2 kifejeződése a körülményektől függetlenül azonos kifejeződést mutat, míg az ER-ben lokalizálódó HwHMG1 enzim aktivitása az optimális értéktől eltérő, annál alacsonyabb vagy magasabb, sókoncentráció mellett megemelkedik (Vaupotič és mtsi. 2008).

6.3.4. A *hmgR* gének relatív transzkripció szintjei különböző szénforrásokon

Arról nem volt előzetes információnk, hogy az egyes szénforrások, hogyan befolyásolják a *hmgR* gének kifejeződését. A vizsgálat során olyan szénforrásokat alkalmaztunk, melyekről korábban bebizonyosodott, hogy kedvező hatással vannak a *Mucor* karotinoid bioszintézisére (Nagy és mtsi. 2012; Papp és mtsi, 2013). A vizsgálatához a *M. circinelloides*-t YNB táptalajon növesztettük 4 napig. Egyedüli szénforrásként glükózt, maltózt, trehalózt, nátrium-acetátot és dihidroxi-acetont (DHA) használtunk.

A gének kifejeződése mellett megvizsgáltuk a törzs adott szénforráson mutatott morfológiáját is (16. ábra). Nátrium-acetáton és DHA-n volt a legszembetűnőbb a morfológiai változás a glükózhoz képest. Nátrium-acetáton vékony, hosszú hifák képződtek (16. ábra piros nyilak), míg DHA-n a tenyészet pellet szerű volt és a hifák rövidek és megvastagodtak (16. ábra fekete nyilak). Maltózzal és trehalózzal kiegészített tápoldatban

nem tapasztaltunk jelentős morfológiai változást a kontrollhoz képest (16. ábra), azonban az artrosporák száma ezeken a szénforrásokon megemelkedett.

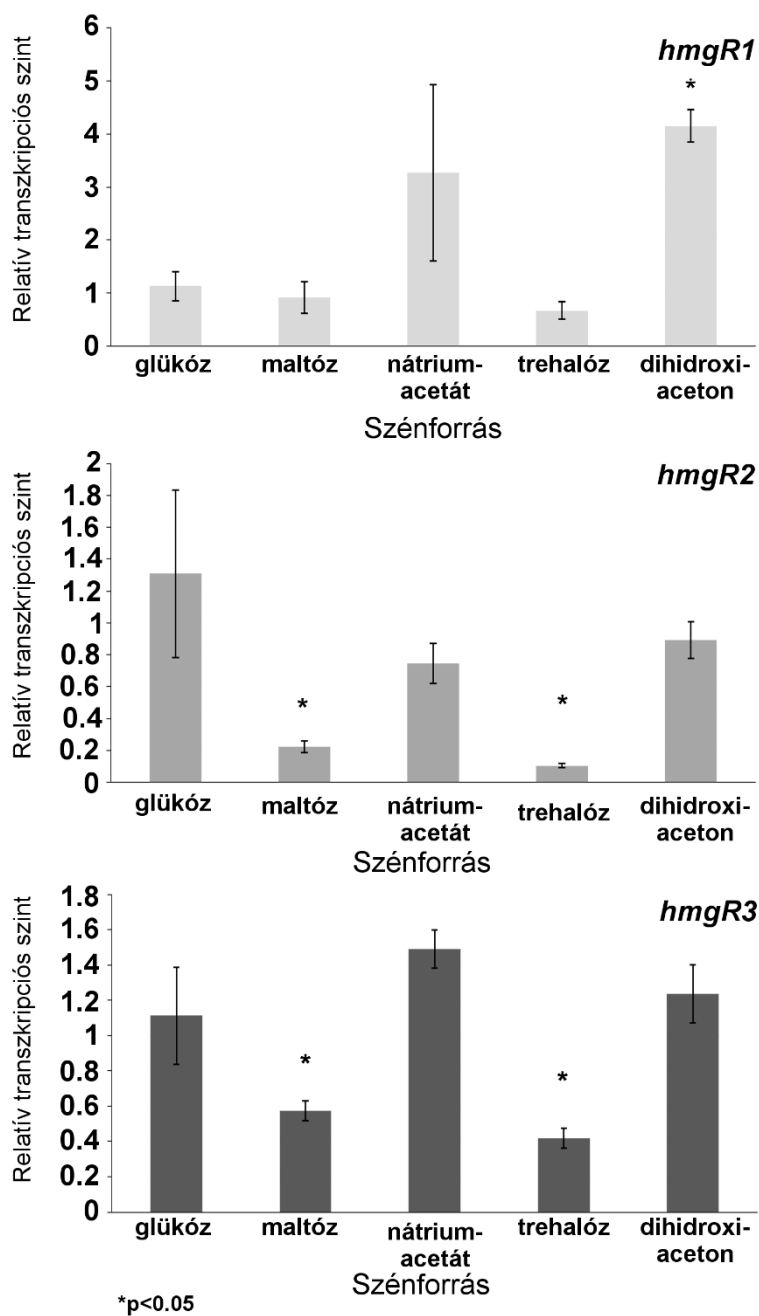


16. ábra. A *M. circinelloides* morfológiai változása a különböző szénforrásokon.

A morfológiai vizsgálathoz a törzset YNB tápoldatban tenyésztettük. A méretskála 10 μm -nek felel meg.

Mindhárom gén esetében magas relatív transzkripció értéket mértünk nátrium-acetát és DHA szénforráson. Ugyanakkor *hmgR2* és *hmgR3* esetében a glükóz ugyancsak magas transzkripció szintet eredményezett. A *M. circinelloides* esetében kimutatták, hogy a glükóz nagyon jó szénforrás a terpének bioszintéziséhez, köztük a karotinok termeléséhez (Papp és mtsi 2013; Mosqueda-Cano és mtsi. 1995). A *hmgR1* esetében a maltózon és a trehalózon mért érték nem különbözött szignifikánsan a glükózon mért értékhez képest, azonban DHA-n jelentősen megnőtt. Ezzel szemben a *hmgR2* és *hmgR3* esetében a relatív transzkripció szint maltózon és trehalózon szignifikánsan lecsökkent, míg DHA-n nem változott (17. ábra).

A nátrium-acetát és a dihidroxi-aceton részt vesznek a glikolízis folyamatában és lehetséges prekursorai a mevalonát útvonalnak. Feltehetőleg ezen prekursorok jelenléte csökkenti a *Mucor hmgR2* gén kifejeződésének mértékét. *Blakesleea* és *Phycomyces* esetében az acetát a *Mucor*-hoz hasonló hatással van a gomba karotin bioszintézisére (Kuzina és mtsi 2007). *Borrelia burgdorferi* esetében az acetát stimulálja a HmgR enzim aktivitását is (Van Laar és mtsi. 2012). Eredményeink azt mutatják, hogy *Mucor* esetében, az acetát mindhárom reduktáz gén működésére a glükózhoz hasonló hatást gyakorol.



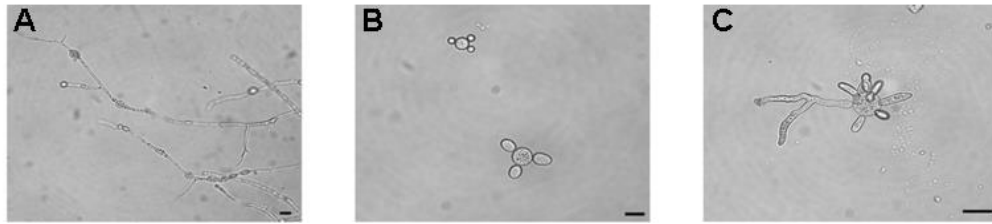
17. ábra. A *hmgR* gének relatív transzkripció szintjei különböző szénforrásokon

Mindegyik gén esetében a glükózon mért értékhez viszonyítottunk. A diagramon három egymástól független mérés eredményeinek átlagértékeit tüntettük fel szórással együtt, * jelzi a glükózon mért értéktől való szignifikáns eltérést. A szignifikancia szint megállapításához párosított t-próbát végeztünk.

6.3.5. A *hmgR* gének relatív transzkripció szintjei aerob és anaerob körülmények között

A *M. circinelloides*-re jellemző a morfológiai dimorfizmus képessége. Oxigén hiányos állapotban és/vagy magas hexóz koncentráció mellett a gomba fonalas növekedése reverzibilisen átvált élesztő-szerű morfológiára. Az oxigén hiányos állapotban kialakult élesztő-szerű sejtek ismét fonalas morfológiát vesznek fel, miután a tenyészet újra oxigén

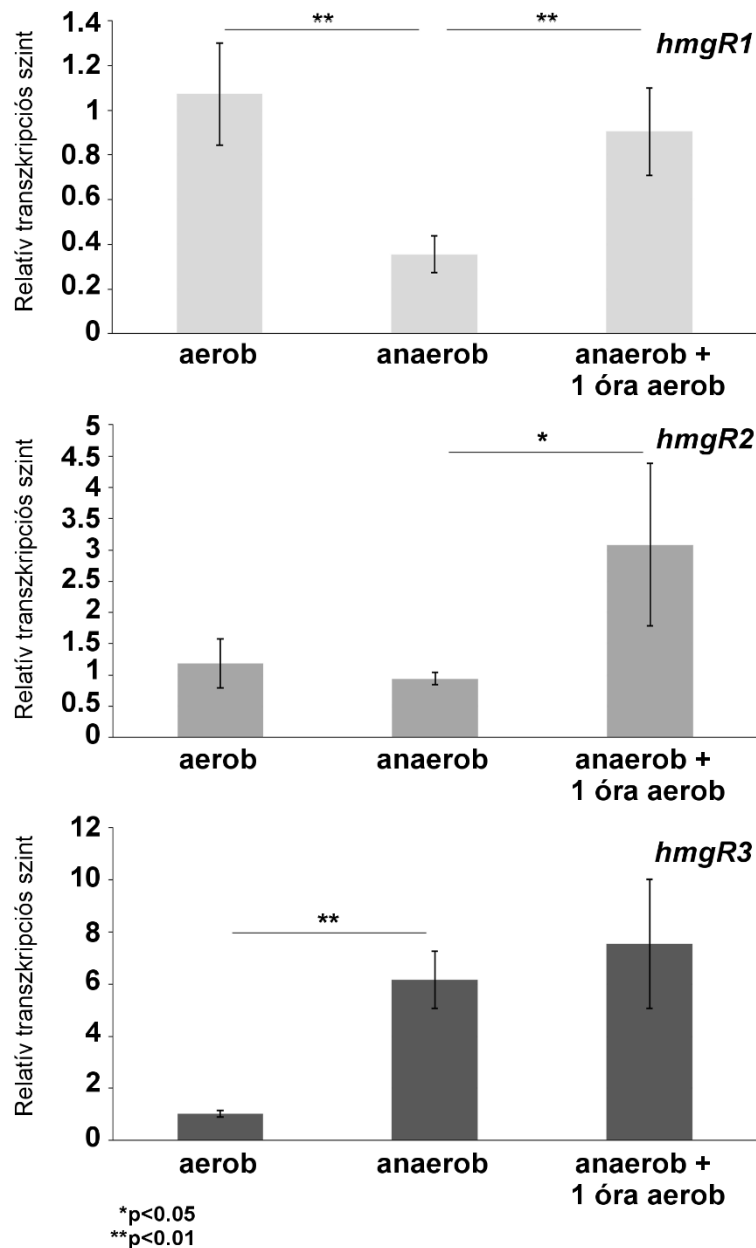
dús környezetbe kerül (18. ábra). Ez a váltás az oxigén megjelenését követő 45. perctől indul be.



18. ábra. A *M. circinelloides* mikromorfológiája aerob és anaerob körülmények között.

Aerob körülmények között fonalas morfológiát mutat (A), mely reverzibilisen átvált élesztő-szerű morfológiává alacsony oxigén szint mellett (B). Aerob környezetben, 45 perc elteltével az élesztő-szerű sejtek fonalakat kezdenek el növesztetni (C). A méretskála 10 μm -nek felel meg.

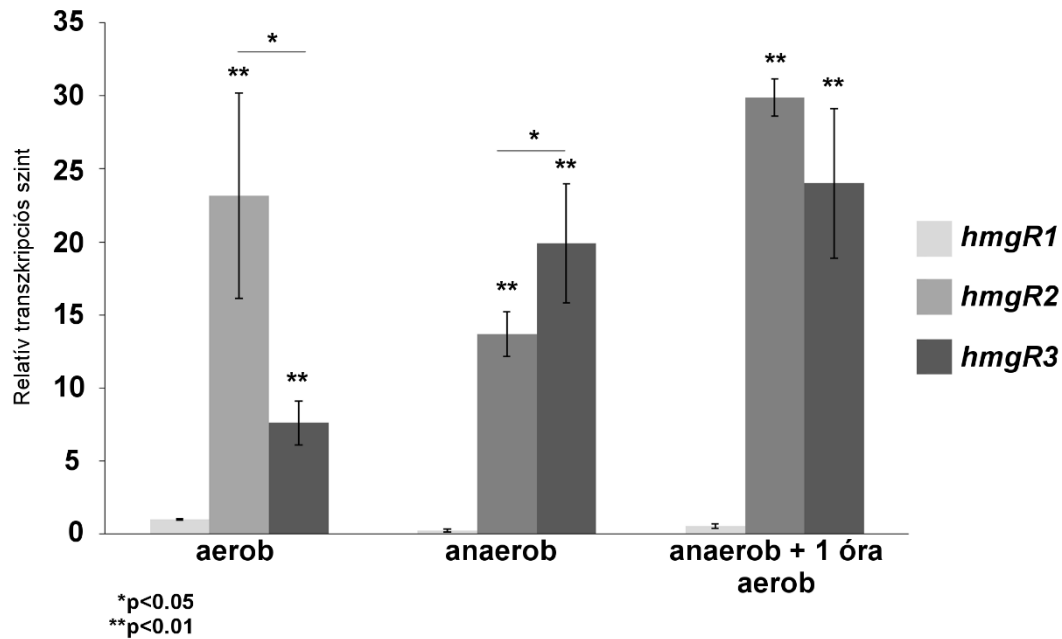
Az intenzív fonálképződés és a megváltozott oxigén ellátottság miatt fontosnak találtuk ebben az állapotban is megvizsgálni az egyes *hmgR* gének transzkripciós szintjeit (19. ábra). A gomba morfológiai változásait a 18. ábrán láthatjuk. Négy napig anaerob körülmény között növesztve a törzset, a *hmgR1* relatív transzkripciós szintje szignifikánsan lecsökkent, míg a *hmgR3* relatív transzkripciós szintje szignifikánsan megnőtt az aerob körülményen mérthez képest. A *hmgR2* esetében nem tapasztaltunk jelentős változást az aerob és anaerob körülményen mért relatív transzkripciók között. Újra oxigéndús környezetbe helyezve az anaerob tenyészetet az élesztő-szerű sejtek hifákat kezdtek el növesztetni. Ebben az állapotban a *hmgR1* és *hmgR2* gén relatív transzkripciós szintje szignifikánsan megemelkedett, míg a *hmgR3* gén relatív transzkripciós szintje nem változott lényegesen az anaerob környezetben mért értékhez képest. Itt is egy intenzív micéliumképzés indul be, hasonlóan a spórák leoltásától eltelt 8. órában (6.3.1. fejezet) és mind a két esetben megfigyelhető a *hmgR2* relatív transzkripciójának szignifikáns emelkedése.



19. ábra. A *hmgR* gének relatív transzkripció szintjei aerob és anaerob körülmények között

Az eredményeket három egymástól független mérés után kaptuk, a szórás jelzi a mérések közötti eltéréseket. Mindegyik gén aerob körülményen mért értékéhez viszonyítottunk. A szignifikancia szint megállapításához párosított t-próbát végeztünk.

Amennyiben összevetjük a három reduktáz gén anaerob és aerob körülmények között mért relatív transzkripció értékeit (20. ábra), általánosságban elmondhatjuk, hogy aerob körülmények között a *hmgR2* mutatja a legmagasabb relatív transzkripció értékeket, míg a *hmgR1* a legalacsonyabbat az összes vizsgált körülményt figyelembe véve. Azonban, anaerob körülmények közt a *hmgR3* az, amelyik a legmagasabb relatív transzkripció szintet mutatja. Az eredmények arra utalnak, hogy *Mucor* esetében a környezet oxigén szintje hatással van a *hmgR* gének kifejeződésére.



20. ábra. A *M. circinelloides* 3 *hmgR* génjének egymáshoz viszonyított relatív transzkripció szintje aerob és anaerob körülmények között.

A *hmgR1* aerob körülményen mért relatív transzkripció szintjéhez viszonyítottunk. Az eredményeket három egymástól független mérés után kaptuk, a szórás jelzi a mérések közötti eltéréseket. A vízszintes vonalak jelzik a *hmgR2* és *hmgR3* gén relatív transzkripciójának szignifikáns különbségeit, míg az oszlopok feletti csillagok a *hmgR1* génhez viszonyított szignifikáns eltérésre utalnak. A szignifikancia szint megállapításához párosítatlan t-próbát végeztünk.

Az alacsony oxigén szint *hmgR* géneket szabályzó szerepét korábban bizonyították *S. cerevisiae*-ben, *Aspergillus fumigatus*-ban, *Cryptococcus neoformans*-ban és *Sch. pombe*-ben is (Bien és mtsi. 2010). Eredményeink azt mutatják, hogy aerob körülmények között a *M. circinelloides* *hmgR1* és *hmgR2* kifejeződése erősebb, mint anaerob körülmények között. Ellenben a *hmgR3* relatív transzkripció szintje anaerob körülmény között szignifikánsan megemelkedik. Ilyen oxigénfüggést a *S. cerevisiae*-nél is megfigyeltek, ahol a Hmg1p aerob körülmények között stabil, erős kifejeződést mutat, míg a Hmg2p kifejeződése gátolt. Anaerob körülmények között viszont a Hmg1p kifejeződése lecsökken, a Hmg2p-é pedig megnő (Burg és mtsi. 2011; Koning és mtsi. 1996).

6.3.6. A relatív transzkripció szint mérések legfontosabb eredményei

Az 4. táblázatban a transzkripció vizsgálatok legfontosabb eredményeit foglaltuk össze. Ezek szerint mind a három gén eltérő mértékben ugyan, de reagál a különböző környezeti ingerekre. Általánosságban elmondható, hogy a három reduktáz gén közül a *hmgR1* aerob környezetben, a *hmgR3* anaerob környezetben fejeződik ki leginkább, míg a *hmgR2* gén kifejeződése minden vizsgált körülmény mellett erőteljes volt.

4. táblázat. A különböző tenyésztési körülmények hatása a *hmgR* gén transzkripciójára.

		<i>hmgR1</i>	<i>hmgR2</i>	<i>hmgR3</i>
Tenyésztési körülmény	Kontroll	Legjelentősebb változások		
Tenyésztési idő	96.óra	4. órában nincs, 48. órában maximum	8. órában maximum	48. órában maximum
Hőmérséklet	25 °C	↓ (35 °C) ↑ (15 és 20 °C)	↓ (30 °C)	↑ (20 °C)
Sóstressz	0% NaCl	↑ (1 és 3% NaCl)	↑ (emelkedő NaCl koncentrációval párhuzamosan)	↑ (1% NaCl)
Szénforrás	glükóz	↑ (dihidroxi-aceton)	↓ (maltóz, trehalóz)	↓ (maltóz, trehalóz)

A lefelé mutató nyíl a transzkriptum szint csökkenését, a felfelé mutató nyíl a transzkriptum szint növekvését jelzi a kontroll állapothoz képest.

A *hmgR1* alig fejeződik ki a spórák csírázásának idejében (a leoltástól számított 4. órában), maximumát a 48. órában éri el. Erős hőmérsékletfüggést tapasztaltunk kifejeződésében, valamint a sóstressz is befolyásolta a gén relatív transzkripcióját. A különböző szénforrások közül csak a DHA indukálta a gén átíródását. A *hmgR2* már igen magas relatív transzkripciós szintet ért el a spórák csírázásnak idején, azonban a kifejeződésének maximumát a leoltástól számított 8. órában, az intenzív micéliumképzés idején, érte el. A sóstressz hatására a gén relatív transzkripciós szintje megemelkedett. Maltózon és trehalózon a gén kifejeződése gátolt volt. A *hmgR3* szintén aktiválódik a spórák csírázásának idején, azonban a relatív transzkripciós szintjének maximumát a leoltástól számított 48. órában éri el. Jelentős oxigénfüggést tapasztaltunk a gén átíródásának vizsgálata során, ugyanis anaerob körülmények között megnő a gén relatív transzkripciós szintje. A szénforrások közül, ahogy a *hmgR2* kifejeződését is, a maltóz és a nátrium-acetát gátolta.

6.4. A *hmgR* gén funkcionális vizsgálata

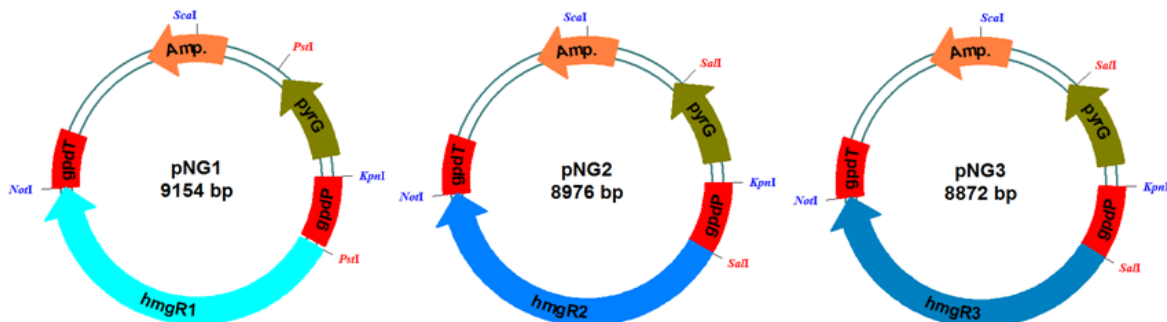
A *hmgR* gén funkcionális vizsgálatának céljából olyan vektorkonstrukciókat terveztünk, melyek lehetővé teszik az egyes gének túlműködtetését, valamint a csendesítését. A kész plazmidokat *M. circinelloides*-be jutattuk és megvizsgáltuk, hogy az egyes gének kópiaszámának növelése (géndózis hatás), illetve csendesítése milyen hatással

van a gomba terpén bioszintézisére, morfológiájára és sztatinnal szembeni érzékenységére.

Korábbi vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy az egyes terpenoidok szintézise egymástól elkülönülve, külön kompartmentekben történik (Bejarano és Credá-Olmedo 1992; Kuzina és mts. 2006). Ennek érdekében szeretnénk azt is megvizsgálni, hogy *M. circinelloides*-ben az egyes *hmgR* géneknek van-e valamelyik terpénszármazék bioszintézisére nézve specifikus szerepe.

6.4.1. A *hmgR* gének túlműködtetése

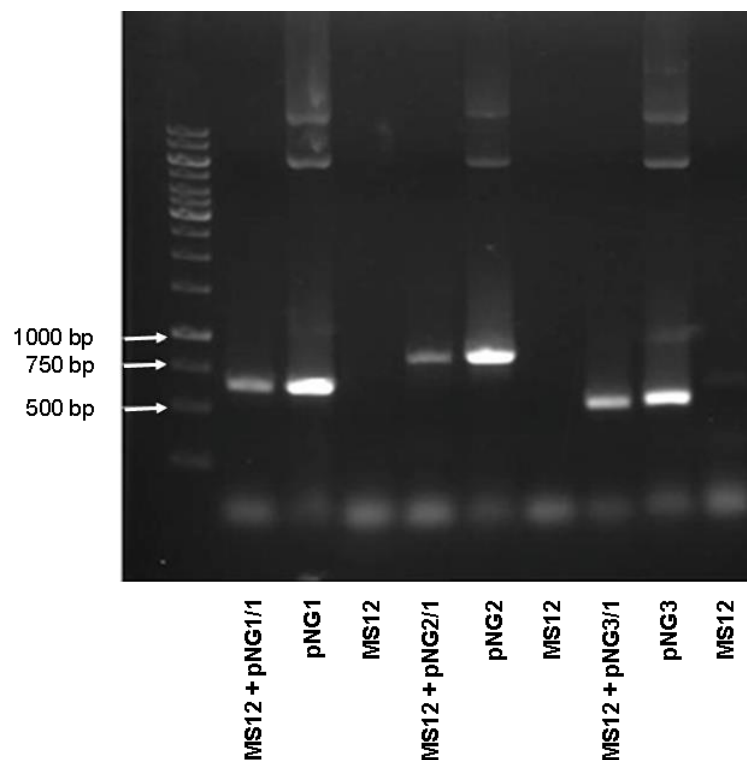
Rendelkezésünkre állt egy *gpdI* promóter és terminális szakaszt hordozó vektor, a pPT43 (Papp és mtsi. 2006) és egy *pyrG* gént hordozó vektor a pPT81. A PCR reakció során felszaporított teljes *hmgR* géneket egyenként pPT43 plazmidba klónoztuk *PstI*-*NotI* (*hmgR1*) és *SalI*-*NotI* enzimek (*hmgR2* és *hmgR3*) segítségével. Így olyan plazmidokat kaptunk, amelyek tartalmazták az egyes *hmgR* géneket, a *gpdI* terminális és promóter régiókat, valamint a bakteriális transzformáció során alkalmazott ampicillin rezisztencia gént. Az így kapott pPT43-*hmgR1*, pPT43-*hmgR2*, valamint a pPT43-*hmgR3* plazmidokba beépítettük a pPT81 plazmidból kivágott *pyrG* gént, *ScaI* és *KpnI* enzimek segítségével, így létrehozva a pNG1 (*hmgR1* gént tartalmazza), pNG2 (*hmgR2* gént tartalmazza) és a pNG3 (*hmgR3* gént tartalmazza) expressziós vektorokat (21. ábra).



21. ábra. A *M. circinelloides* *hmgR* génjeinek túlműködtetéséhez készített expressziós vektorok

Mindhárom vektorral sikeres PEG-mediált protoplaszt transzformációt hajtottunk végre az MS12 törzzsel. A transzformánsok szelektálását az uracil auxotrófia komplementálása alapján végeztük. A pNG1 és a pNG2 esetében 8, míg a pNG3 esetében 6 transzformáns telepet kaptunk. 2-2 telep esetében qPCR segítségével megmértük a gének relatív transzkripcióját. Az MS12-pNG1 transzformánsok esetében a *hmgR1* gén relatív transzkripciója mintegy tízszeresre, az MS12-pNG2 transzformánsok esetében a *hmgR2* gén relatív transzkripciója háromszázszorosra, míg az MS12-pNG3 transzformánsok esetében

hmgR3 gén relatív transzkripciója hetvenszeresre nőtt az MS12-ben mért értékekhez képest. Az egyes transzformánsokban a másik két gén relatív transzkripciós szintjében nem történt szignifikáns változás. A pNG1 vektort hordozó transzformánsokban a plazmid kópiaszáma 2-4, a pNG2 vektort hordozó transzformánsok esetében a plazmid kópiaszáma 7-8, míg a pNG3 vektort hordozó transzformánsok esetében a plazmid kópiaszáma 1-4 kópia/genom között mozgott.



22. ábra. A pNG1, pNG2 és pNG3 plazmidok jelenlétének igazolása a transzformánsokban.

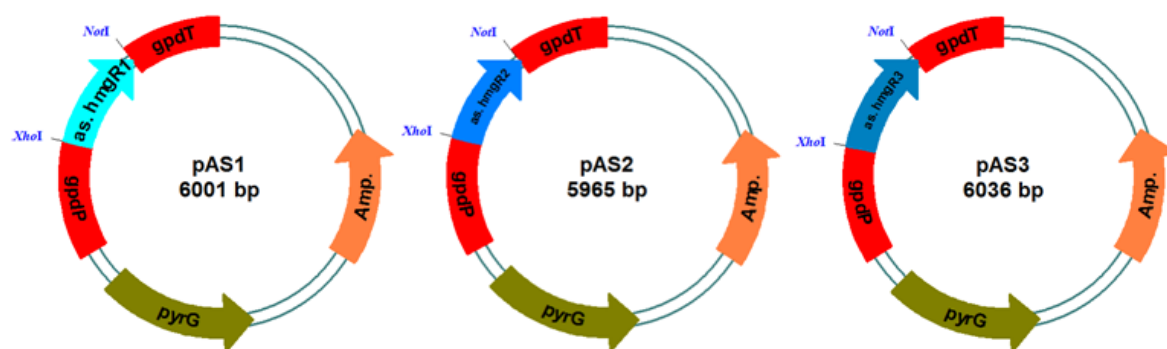
A *gpdP*-re és az egyes *hmgR* gének kezdeti szakaszára tervezett primerekkel végzett PCR kísérletek során a recipiens MS12 törzsből nem kaptunk amplifikációs terméket, míg a transzformánsokból (MS12+pNG1/1, MS12+pNG2/1, MS12+pNG3/1) és a kontrollként használt plazmidokból (pNG1, pNG2 és pNG3) igen.

A plazmidokat a gomba autonóm replikatív módon tartotta fenn. A transzformánsokban a plazmid jelenlétét PCR reakció segítségével mutattuk ki. A reakcióhoz a *gpd* promóter végére és az egyes reduktáz gének elejére tervezett primereket használtuk. A PCR reakciók során a recipiens MS12 törzsből nem kaptunk PCR terméket, míg a kontrollként használt plazmidokból és a transzformánsokból igen (22. ábra), ezzel igazolva a plazmidok jelenlétét a transzformánsokban. Mindhárom transzformációs kísérlet után 2-2 transzformánst kiválasztottunk és a továbbiakban ezeket vizsgáltuk részletesebben.

6.4.2. A *hmgR* gének csendesítését lehetővé tevő vektorkonstrukciók építése

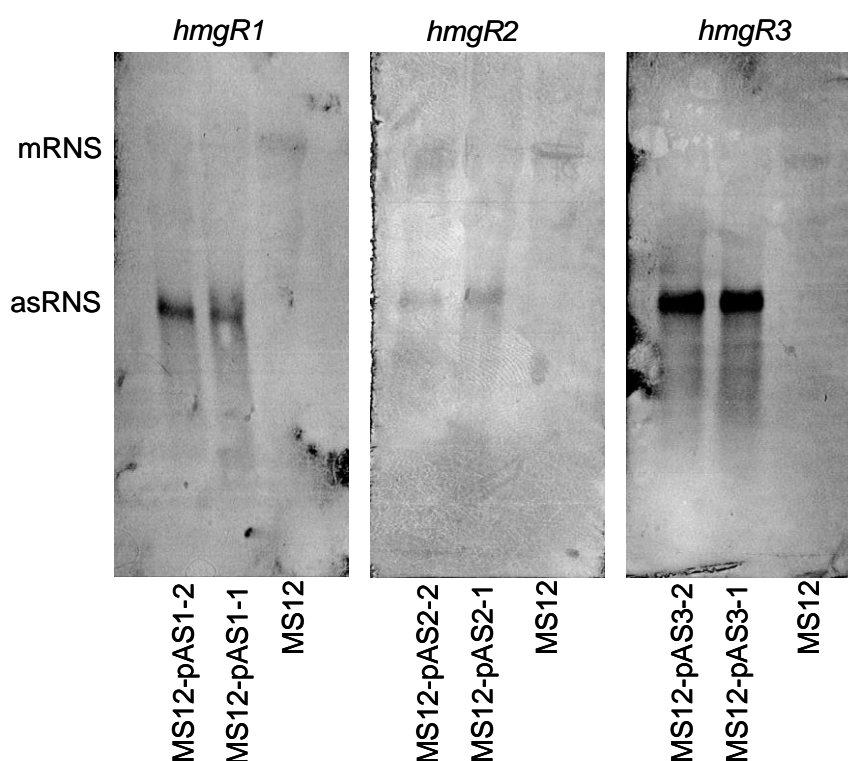
Az egyes *hmgR* gének csendesítését antiszensz RNS (asRNS) technikával valósítottuk meg. Rendelkezésünkre állt a korábban említett pPT81 plazmid, melybe a

bejuttatott génszakaszokat a *gpd* promóter és terminális szakaszok közé építettük be, fordított orientációban, a *NotI*-*XhoI* hasítóhelyek közé, így létrehozva a pAS1, pAS2 és pAS3 vektorokat (23. ábra). A *hmgR1* esetében a csendesítéshez használt szakasz 661 bp (a gén 5' végétől számított 29-630 nukleotid), a *hmgR2* esetében 625 bp (a gén 5' végétől számított 21-646 nukleotid) és a *hmgR3* esetében 697 bp (a gén 5' végétől számított 51-748 nukleotid) hosszú volt.



23. ábra. A *M. circinelloides hmgR* gének csendesítéséhez szerkesztett vektorok.

A létrehozott vektorokkal (23. ábra) sikeres PEG-mediált protoplaszt transzformációt hajtottunk végre az MS12 törzsszel.



24. ábra. Az *asRNS* kimutatása Northern hibridizációval.

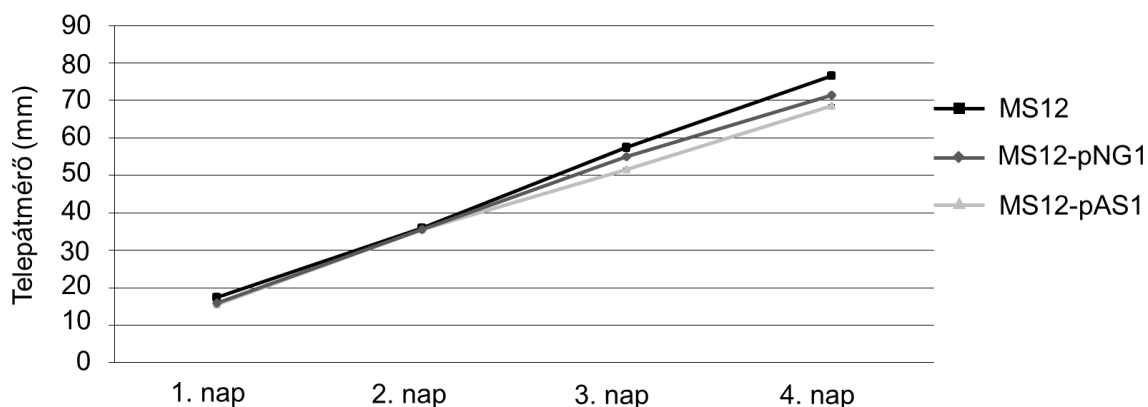
A pAS1 és pAS3 vektorral transzformálva 6-6, míg a pAS2 vektorral transzformálva 3 transzformáns telepet kaptunk. A plazmidok fennmaradása érdekében a transzformánsok

tenyésztését szelektív körülmények közt végeztük. A plazmidokat a gomba autonóm replikatív módon tartotta fel. A transzformánsokból Northern-hibridizáció segítségével mutattuk ki a plazmidról átíródó asRNS molekulákat (24. ábra). A csendesítés hatékonyságát transzformációs kísérletenként két-két transzformáns esetében qPCR segítségével vizsgáltuk. Az egy transzformációs kísérletből származó, különböző transzformánsokban eltérő volt a csendesítési hatékonyság, feltételezhetően a bejuttatott plazmidok kópiaszámának és kifejeződésének eltérései miatt. A *hmgR1* gén relatív transzkripció szintje az egyes csendesített transzformánsokban 70, illetve 90%-kal, a *hmgR2* gén relatív transzkripció szintje 75 és 76%-kal, míg a *hmgR3* gén relatív transzkripció szintje 59 és 95%-kal csökkent az MS12-ben mért értékhez képest. A további vizsgálatok során, minden gén esetében e két-két izolátumot elemeztük és azok eredményeit ábrázoltuk (25-27. ábra és 5, 6. táblázat). A fénymikroszkópos felvételeken a legnagyobb csendesítési hatékonyságot mutató törzsek láthatók (28-36. ábra).

6.4.3. A mutáns törzsek növekedésének vizsgálata

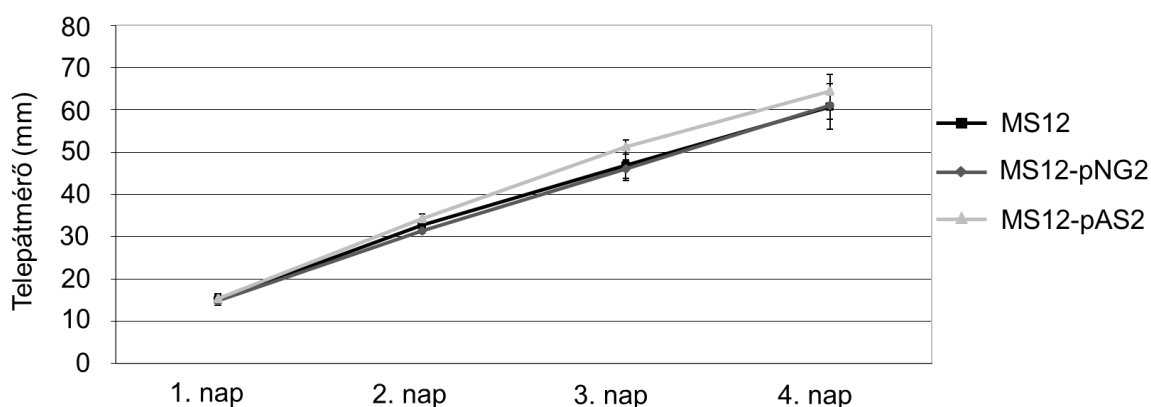
A túlműködtetett és csendesített transzformánsok előállítását és a transzformáció sikerességének igazolását követően megkezdjük a törzsek növekedési képességének a vizsgálatát. A spórák csírázási képességének meghatározásához a telepekről steril desztillált vízzel lemostuk a spórákat, majd 30 ml YNB tápoldatba oltottuk azokat úgy, hogy a spórakoncentrációt minden esetben 10^5 spóra/ml-re állítottuk be. A spórák csírázásának szinkronizálása céljából a beoltott tápoldatokat egy éjszakán keresztül 4 °C-on tartottuk, majd másnap 25 °C-on, 200 rpm sebességgel rázattuk. Óránkénti mintavételezéssel vizsgáltuk a megjelenő csíratömlőket. A telepátmérő növekedésének vizsgálatához szilárd YNB táptalaj közepére 10^5 spórát cseppentettünk, amit steril fülke alatt beszárítottunk. A leoltástól számítva 4 napon keresztül vizsgáltuk a növekvő telepek átmérőjét. A megfigyelést minden gén esetében két túlműködtetett és két csendesített transzformánssal, három-három párhuzamosban végeztük és azok átlagát ábrázoltuk a diagramokon. Kontrollként a *M. circinelloides* MS12 törzsét használtuk.

A 25. ábrán látható a *hmgR1* gént túlműködtető (MS12-pNG1) és csendesített (MS12-pAS1) mutánsok növekedési rátája. A csíratömlők megjelenése mind a csendesített (MS12-pAS1), mind a túlműködtetett (MS12-pNG1) izolátumok esetében a leoltástól számított 4. órában jelent meg, mint a vad típusú törzs esetében. Emellett az egyes transzformáns törzsek növekedésében és a telepátmérőikben sem tapasztaltunk jelentősebb változást az MS12-höz képest.



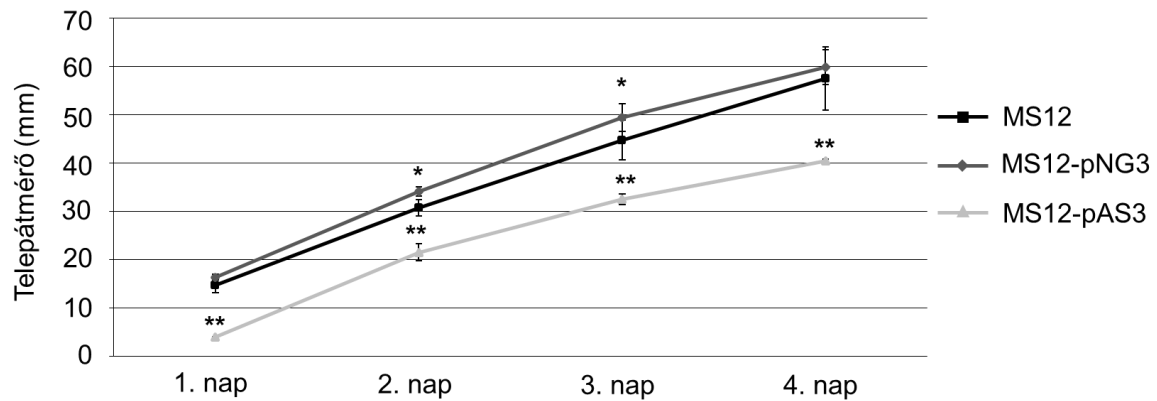
25. ábra. A *hmgR1* gén túlműködtetésének (MS12-pNG1 transzformánsok) és csendesítésének (MS12-pAS1 transzformánsok) hatása a gomba növekedésére.

A *hmgR2* gén túlműködtetésének (MS12-pNG2) és csendesítésének (MS12-pAS2) hatására nem tapasztaltunk változást a gomba növekedési rátájában (26. ábra). Az MS12-pNG2 izolátumok spóráinak csírázási ideje megegyezett az MS12 spóráinak csírázási idejével, azonban a gén csendesítésének hatására az MS12-pAS2 izolátumok spóráinak csírázási ideje a leoltástól számított 4. órától az 5. órára tolódott ki.



26. ábra. A *hmgR2* gén túlműködtetésének (MS12-pNG2 transzformánsok) és csendesítésének (MS12-pAS2 transzformánsok) hatása a gomba növekedésére.

A *hmgR3* gén túlműködtetésének hatására a transzformánsok (MS12-pNG3) esetében nagyobb telepátmérőt mértünk az MS12-höz képest, azonban ezen transzformáns törzsek spóráinak csírázási ideje nem változott. A gén csendesítése során azonban a transzformánsok (MS12-pAS3) növekedési sebessége és telepátmérője lecsökkent (27. ábra). A spórák csírázóképeségének vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a pAS3 vektort hordozó izolátumok spóráinak csírázó képessége lecsökkent. Ezen izolátumok spóráinak csírázási ideje a leoltástól számított 4. órától a 8. órára tolódott ki. A folyadéktenyésztetben történt nevelés során feltűnt, hogy még a leoltástól számított 4. napon is nagyszámú ki nem csírázott spóra volt jelen a tápoldatban.



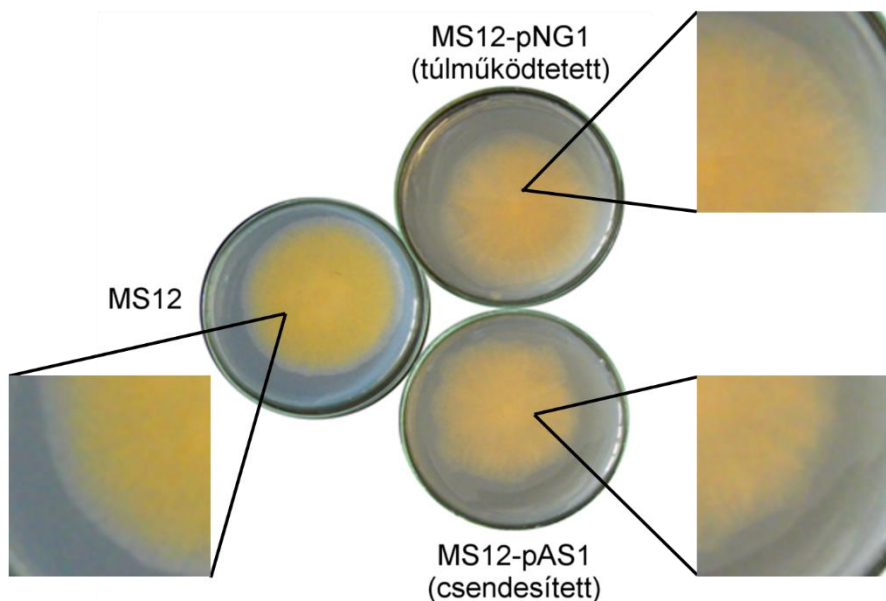
27. ábra. A *hmgR3* gén túlműködtetésének (MS12-pNG3 transzformánsok) és csendesítésének (MS12-pAS3 transzformánsok) hatása a gomba növekedésére.

Az MS12 esetében mért értéktől való szignifikáns eltérést a * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ jelzi. A szignifikancia szint mérésére párosítatlan t-próbát végeztünk.

Eredményeink azt mutatják, hogy az egyes gének túlműködtetése nem befolyásolja a gomba növekedési sebességét és a képződő telep átmérőjét. *F. graminearum* HMG-KoA reduktáz gén mutációjának hatására a mutáns törzs növekedése lelassult és csökkent virulenciát mutatott búzával szemben (Seong és mtsi. 2006). A *Mucor hmgR3* gén csendesítésének hatására a transzformáns törzsek növekedése a *Fusarium*-nál tapasztaltakhoz hasonlóan lecsökkent. *S. cerevisiae*-ben ismert, hogy a HMG-KoA reduktáznak fontos szerepe van a spórák csírázásában és a vegetatív sejtek növekedésében (Bason és mtsi. 1986). Eredményeink arra utalnak, hogy *Mucor*-ban a három HMG-KoA reduktáz közül HmgR3-nak lehet jelentősebb szerepe a spórák csírázásában és a vegetatív sejtek növekedésében.

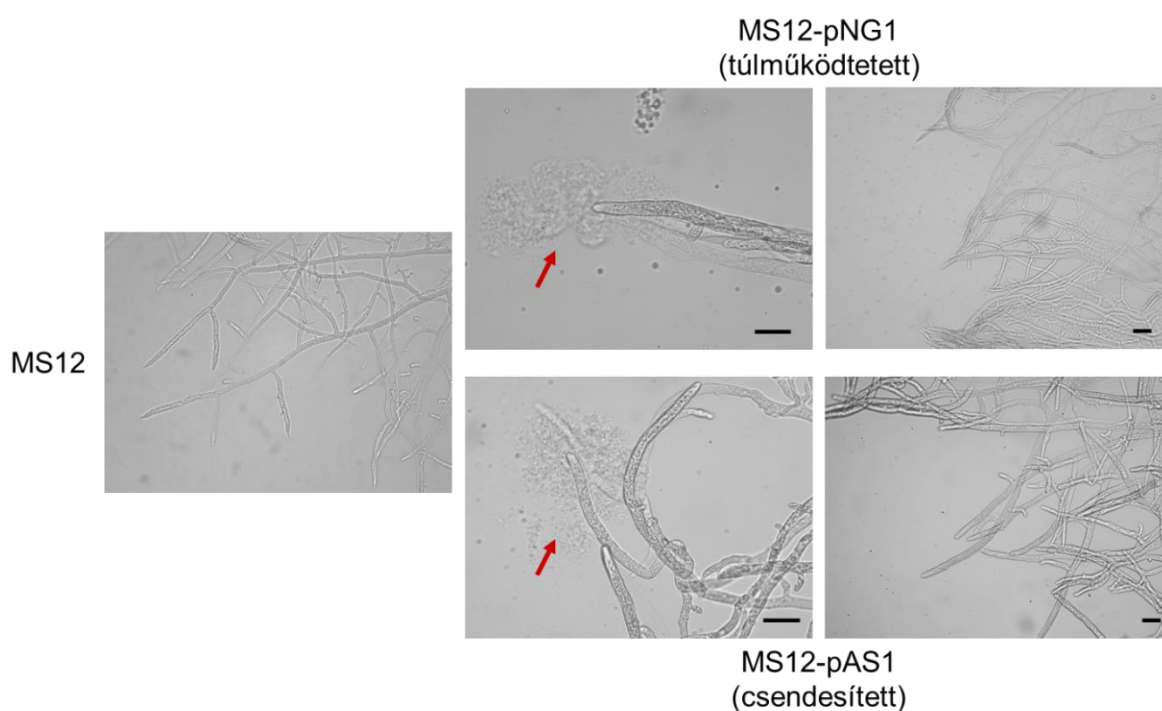
6.4.4. A *hmgR* gének túlműködtetésének és csendesítésének hatása transzformáns törzsek makro- és mikromorfológiájára

A makro- és mikromorfológia vizsgálatához a transzformáns törzseket YNB táptalajon növesztettük 4 napig 25 °C-on. A vizsgálathoz a szilárd táptalaj közepére 20 µl spóraszuszpenziót cseppentettünk, mely 10^5 spórát tartalmazott, majd figyeltük a növekvő gombatelepek morfológiáját. Kontrollként az MS12-t használtuk. A transzformáns telepek közül 2-2 izolátumot vizsgáltunk, azonban csak egy-egy csészefotót tüntettem fel. A mikromorfológiai vizsgálatokat fénymikroszkóppal végeztük, amihez a felnövő telepek széléről steril szike segítségével vágtuk ki a mintául szolgáló telepdarabokat.



28. ábra. Az MS12, MS12-pNG1 és MS12-pAS1 törzsek telepmorfológiája

A *hmgR1* gén túlműködtetésének és csendesítésének hatására az MS12-pNG1 és MS12-pAS1 izolátumok telepmorfológiájában nem tapasztaltunk jelentős változást az MS12-nél tapasztaltakhoz képest (28. ábra). Mindkét transzformáns izolátum szabályos telepmorfológiát mutat, a telepek széle kissé karéjosított.



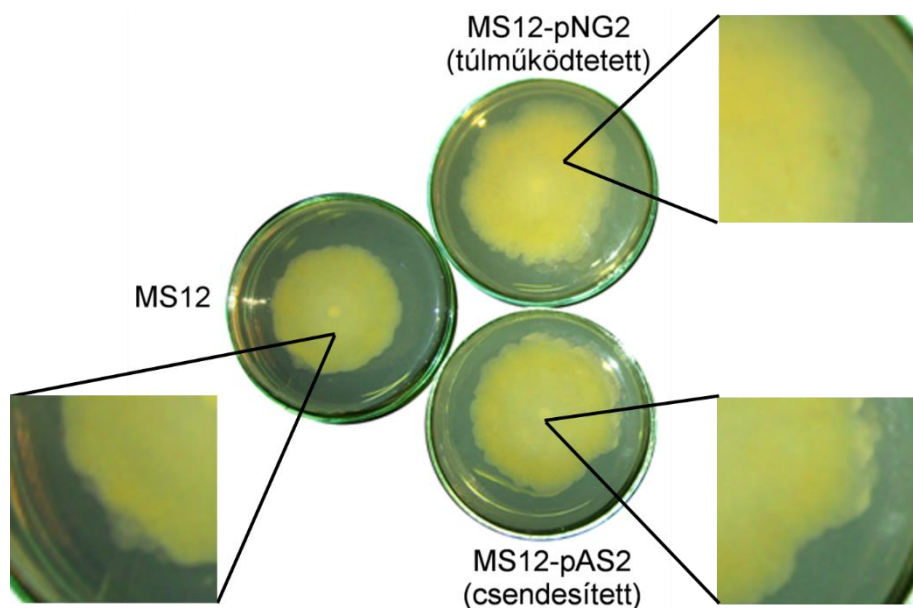
29. ábra. Az MS12, MS12-pNG1 és MS12-pAS1 izolátumok fénymikroszkópos képe.

A méretskála 10 μm -nek felel meg. A piros nyilak a plazmakiáramlásokat mutatják.

A telepek homogén szerkezetűek és, ahogy az ábrán is látható közel azonos méretű telepátmérővel rendelkeznek, mint az MS12.

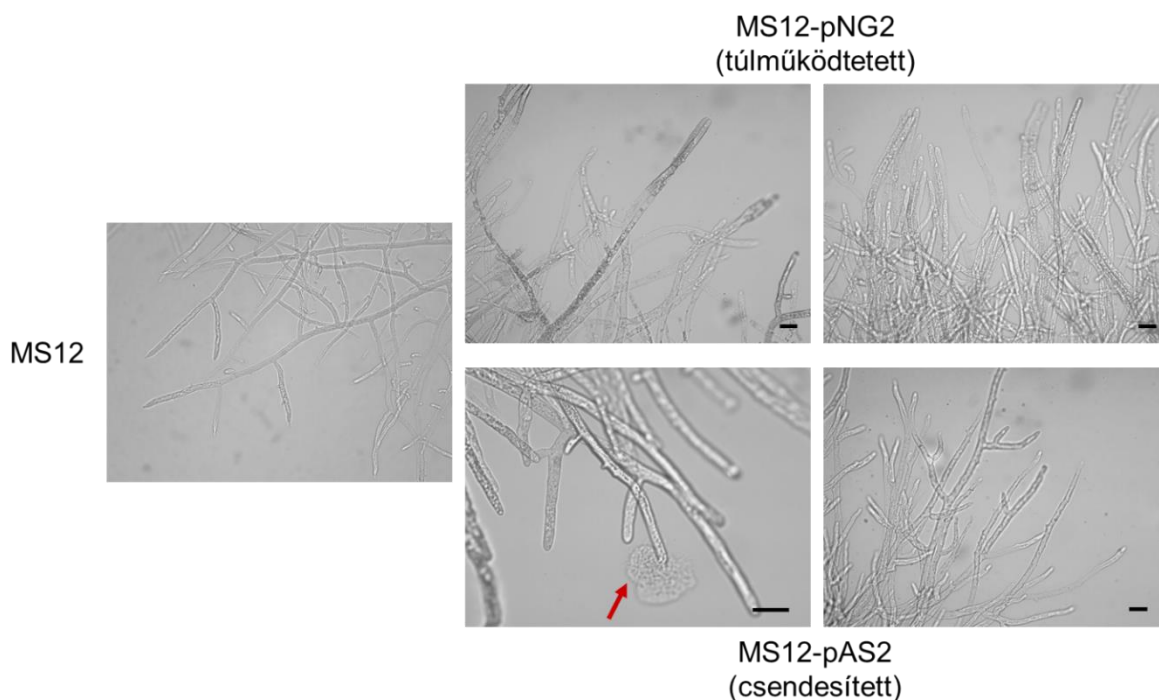
Az MS12-pNG1 és MS12-pAS1 transzformánsok esetében, a telepek fénymikroszkópos tanulmányozása során plazmakiáramlásokat figyeltünk meg a hifavégeken (29. ábra). A plazmakiáramlásokon kívül mikromorfológiai eltérést nem tapasztaltunk a vad típusú törzshöz képest. A hifák vékonyak, megnyúltak valamint kevés elágazást tartalmaznak, mint az MS12 esetében. A plazmakiáramlások valamilyen sejten belüli folyamat zavarára és/vagy a sejtmembrán, vagy a sejtfal szerkezetében bekövetkezett változásra utalnak. Hasonló plazmakiáramlásokat az MS12 esetében nem találtunk.

A *hmgR2* gén túlműködtetésének és csendesítésének hatására az MS12-pNG2 és MS12-pAS2 izolátumok telepmorfológiájában sem tapasztaltunk jelentős változást az MS12-nél tapasztaltakhoz képest (30. ábra). Mindkét transzformáns esetén a szabályostól kissé eltérő telepmorfológiát találtunk, a telepek széle kissé karéjzottá vált. A micéliumtömeg ezeknél a transzformánsoknál is homogén szerkezetű, eltérő színű és mintázatú szektorokat nem találtunk.



30. ábra. Az MS12, MS12-pNG2 és MS12-pAS2 törzsek telepmorfológiája.

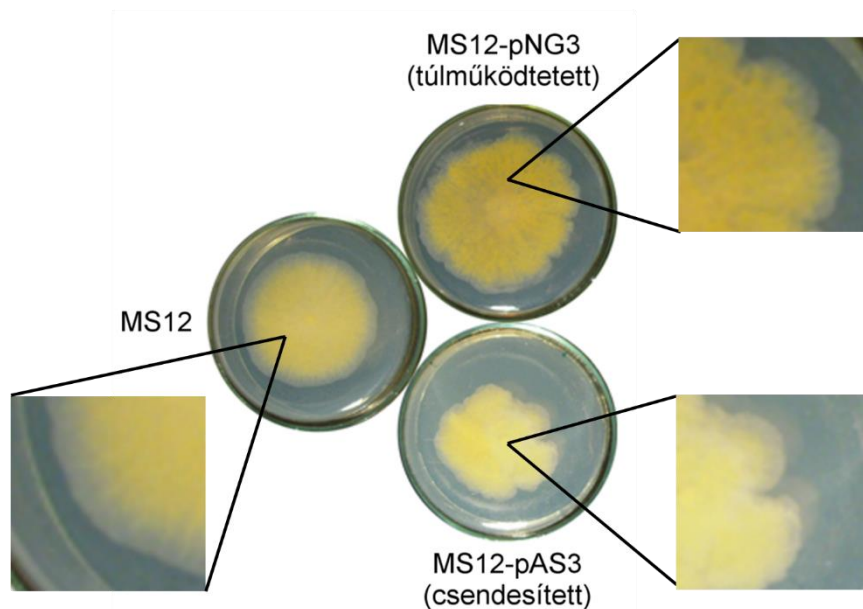
A 31. ábrán látható, hogy az MS12-pAS2 transzformáns fénymikroszkópos vizsgálata során plazmakiáramlásokat figyelhetünk meg, viszont a túlműködtetett mutánsnál ilyen nem tapasztaltunk. A végálló hifák makromorfológiája ezekben a mutánsokban sem változott meg. A hifák szabályos szerkezetűek, az elágazások számában és a hifák vastagságában nem következett be változás.



31. ábra. Az MS12, MS12-pNG2 és MS12-pAS2 izolátumok fénymikroszkópos képe.

A méretskála 10 μm -nek felel meg. A piros nyíl a plazmakiáramlásokat mutatja.

A 32. ábrán látható, hogy a *hmgR3* gén túlműködtetésének hatására a gombatelep nagysága, szabályos formája megváltozott, a telep széle karéjoszottá vált.

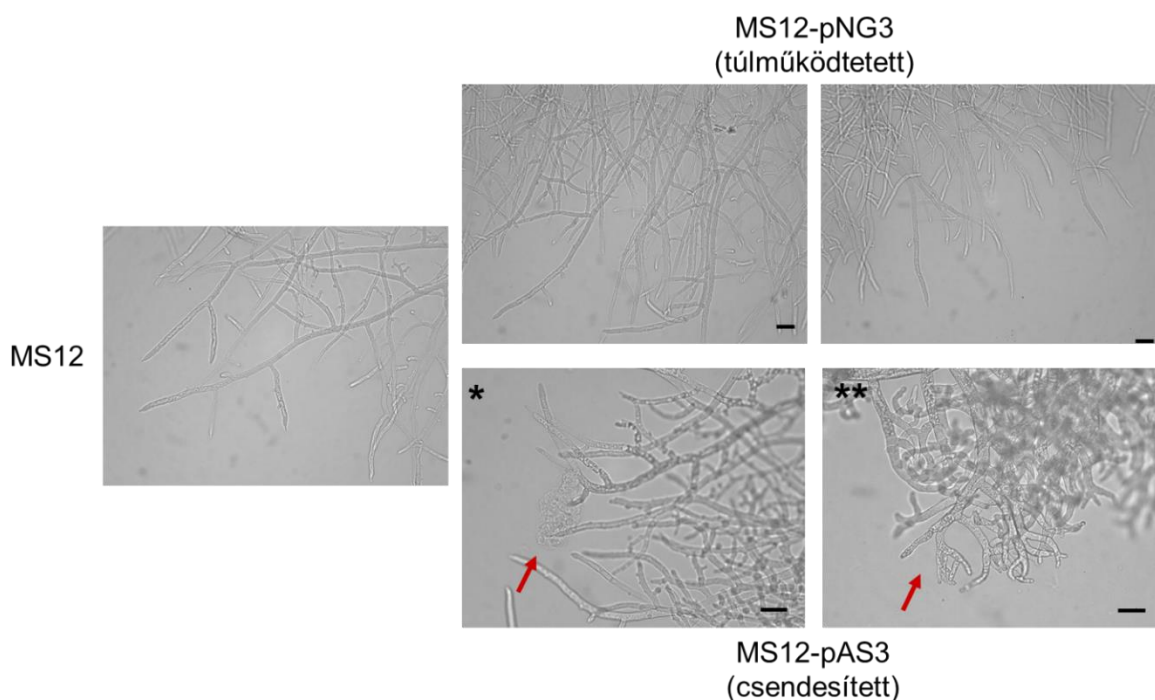


32. ábra Az MS12, MS12-pNG3 és MS12-pAS3 törzsek telepmorfológiája.

A gén csendesítésének hatására a telep morfológiai változása még ennél is szembetűnőbb. A leoltástól számított 4. napon a telepátmérő kisebb, mint az MS12 esetében, valamint a telep karéjoszottsága sokkal szembetűnőbb. Az MS12-pAS3 transzformánsok növekedési rátájának vizsgálata során is tapasztaltuk, hogy a *hmgR3* gén csendesítésének

hatására csökkent e törzsek növekedése és ezzel együtt a gombatelep átmérője (6.4.3. fejezet) A micéliumtömeg nem egységesen homogén, hanem különböző szektorokat figyelhattunk meg, melyek színe a fehértől az erős sárgáig változott. Ezen szektorok karéjosztottságában is eltéréseket tapasztaltunk. A mikromorfológiai vizsgálatokhoz a mintákat úgy választottuk ki, hogy a fehér és a sárga szektor mikromorfológiáját is meg tudjuk vizsgálni.

Az MS12-pNG3 transzformánsok esetében jelentős változásokat nem tapasztaltunk a hifák morfológiájában, azonban az MS12-pAS3 törzsek esetében a végálló hifák megduzzadtak, a hosszuk lerövidült és megnőtt az elágazások száma (33. ábra). Ezek a változások leginkább azokon a területeken voltak megfigyelhetők, ahol megjelentek fehér szektorok a micéliumtömegben. A színtelen szektorokban feltehetőleg e változások hatására a gomba nem tudott tovább növekedni. Az ép, sárga színű területeken a végálló hifák ugyan megvastagodtak, de nem rövidültek meg, azonban ezeken a területeken számos plazmakiáramlást láthattunk.



33. ábra. Az MS12, MS12-pNG3 és MS12-pAS3 izolátumok fénymikroszkópos képe.

Az MS12-pAS3 izolátum esetében a *-al jelölt minta egy sárga, alig karéjosztott szektorból való, míg a **-al jelölt minta egy fehér, erősen karéjosztott szektorból való. A méretskála 10 μm -nek felel meg. A piros nyilak a plazmakiáramlásokat mutatják.

Ezen változások egyik lehetséges magyarázata a transzformáció során bejutatott plazmid eltérő eloszlása a micéliumokban. Azokban a szektorokban, ahol fokozott zavar következett be a növekedésben és/vagy a hifák mikromorfológiájában valószínűleg a

csendesítési hatékonyság magasabb, mint az ép teleprészekben. A bejuttatott plazmidok eltérő eloszlását *Absidia*-ban is megfigyelték, ahol génexpressziós vizsgálatokhoz *gfp*-t használtak. A transzformációt követően a GFP eloszlása nem volt homogén. Bizonyos szektorokban megjelent, míg más szektorok elvesztették a plazmidot (Schilde és mtsi. 2001).

Az MS12-pAS3 transzformánsokra ezen változásokon kívül jellemző volt, hogy a spóráinak csírázó képessége lecsökkent. Nem csak a csíratömlő megjelenésének ideje nőtt meg, hanem az életképes spórák száma is lecsökkent. A csendesített izolátumokat gyakran csak egy telepdarab friss táptalajra való helyezésével lehetett továbboltani. Amennyiben olyan telepdarabot oltottunk tovább, mely az aktívan növekvő teleprészből származott, a friss táptalajon ismét megjelentek különböző szektorok. A 10. átvitel ciklus után a gyengén növekvő és szektorokat mutató transzformánsok elvesztették ezt a jellegzetes fenotípust, de amennyiben ismét kevés spórát oltottunk ki friss táptalajra újból megjelent ez a tulajdonság. Feltehetőleg a gomba próbálta eliminálni a plazmidról átvitelű asRNS-t. A világos színű szektorokban a karotin termelés nem volt jelentős és a gomba abban az irányba nem is nőtt tovább. Valószínűleg ezeket a területeket a gomba valamilyen védelmi mechanizmus útján lezárta.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a gomba növekedésében és morfogenezisében is jelentős szerepet kap a *hmgR3* gén terméke. A *hmgR3* csendesítésének hatására nem csak a gomba növekedése lassult le, hanem a makro- és mikromorfológiája is jelentősen megváltozott. *F. graminearum* HMG-KoA reduktáz gén mutációjának hatására a végálló hifák elágazásaink száma megnőtt (Seong és mtsi. 2006). Hasonló elágazás-számbeli különbséget találtunk a *Mucor hmgR3* gén csendesítésének hatására is. Növényekben a HMG-KoA reduktáz központi szerepet játszik az embrióban a magfejlődés során (Stermer és mtsi. 1994). A magfejlődés korai szakaszában, amikor intenzív növekedés jellemző, szükséges az enzim jelenléte, hogy létrejöhessenek a különböző fontos izoprén származékok. Ezen kívül az enzim esszenciális a sejtdifferenciálódás és a sejtnövekedés folyamataiban is. Basson és munkatársai (1986) kimutatták *S. cerevisiae*-ben az enzim központi szerepét a sejtek vegetatív növekedésében. Az élesztő mind két reduktáz génjének egyidejű deletálása letális. A *hmgR3* gén terméke eredményeink alapján fontos szerepet játszik a gomba növekedéséhez és a sejtek differenciálódásához kulcsfontosságú izoprén bioszintézisében. A *hmgR1* esetében nem csak a gén túlműködtetése, de a csendesítése is plazmakiáramlásokat eredményezett, hasonlóan a *hmgR2* gén csendesítéséhez. E két gén termékének tehát szerepe lehet a citoplazmamembrán integritásának fenntartásában.

6.4.5. A transzformáns törzsek karotin és ergoszterin tartalmának vizsgálata

A vizsgálathoz az egyes izolátumokat 4 napig állandó megvilágítás mellett tenyésztettük 25 °C-on. A telepeket csipesszel gyűjtöttük be a táptalaj felszínéről. A karotin kivonást friss, nedves micéliumból végeztük el, a karotinoidok mennyiségi meghatározásához spektrofotométert használtunk. Az ergoszterin kivonáshoz szárított micéliumot használtunk, majd HPLC analízissel mértük a termelődött mennyiséget. A kivonásokat 2-2 transzformáns izolátum felhasználásával végeztük és az eredményeket átlagoltuk. Az 5. táblázatban látható a különböző transzformánsok karotin, illetve ergoszterin tartalma az MS12-höz viszonyítva.

A *hmgR1* gén túlműködtetése és csendesítése nem befolyásolta jelentősen a gomba karotin, illetve ergoszterin tartalmát. Az táblázatban látható, hogy az MS12-nél mért karotin tartalmat nem haladta meg a transzformánsok karotin tartalma és ugyan ez igaz az ergoszterin tartalomra is, ahol a vizsgált törzsek ergoszterin tartalma a 6 mg/g körül mozgott.

5. táblázat. A *hmgR1* gén túlműködtetésének és csendesítésének hatása a gomba karotin és ergoszterin tartalmára.

	Karotin tartalom ($\mu\text{g/g}$ [szárastömeg] \pm szórás)	Ergoszterin tartalom (mg/g [szárastömeg] \pm szórás)
MS12	476 \pm 65	6,0 \pm 0,8
MS12-pNG1	460 \pm 68	5,9 \pm 1,1
MS12-pAS1	487 \pm 41,4	5,1 \pm 0,12
MS12-pNG2	741 \pm 86 **	7,4 \pm 0,8 *
MS12-pAS2	457 \pm 74,3 *	4,4 \pm 0,01 *
MS12-pNG3	846 \pm 62 **	6,5 \pm 1,1
MS12-pAS3	193,2 \pm 48,4 **	3,8 \pm 0,16 **

A táblázatokban 3 egymástól független mérés eredményeinek átlagát \pm a szórás értékeit tüntettük fel. Az MS12 törzs esetében mért értékektől való szignifikáns eltérést * ($p < 0.05$), illetve ** ($p < 0.01$) jelzi. A szignifikancia szint mérésére párosítatlan t-próbát végeztünk.

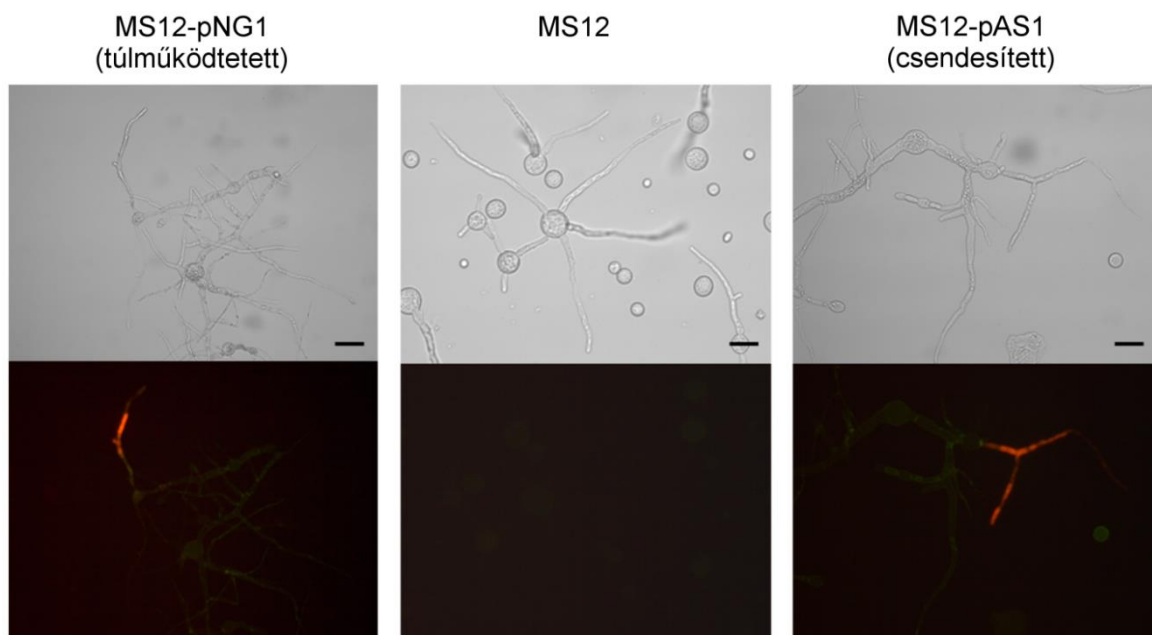
A *hmgR2* gén túlműködtetésének hatására a transzformáns törzsekben (MS12-pNG2) szignifikánsan megnövekedett a karotin és az ergoszterin tartalom az MS12-nél mért értékhez képest. A gén csendesítésének hatására azonban a pAS2 vektort hordozó transzformánsok esetében nem változott a karotin tartalom, ellenben az ergoszterin szint 4,4 mg/g értékre csökkent.

A *hmgR3* gént túlműködtetve szignifikánsan nőtt a pNG3-as vektort hordozó transzformánsok karotin tartalma, azonban az ergoszterin tartalmuk jelentősen nem változott. A csendesített transzformánsok esetében (MS12-pAS3), mind a karotin, mind az ergoszterin tartalmuk csaknem a felére csökkent.

Eredményeink azt mutatják, hogy a pNG1 és pAS1 vektort hordozó transzformánsok karotin és ergoszterin tartalma nem változott jelentősen az MS12-nél mért értékekhez képest, vagyis a *hmgR1* működése nem befolyásolja e két termék képződését a *M. circinelloides* esetében. A *hmgR2* és *hmgR3* működése befolyásolja mind a karotin, mind az ergoszterin tartalmat, ugyanis e gének túlműködtetésének és csendesítésének hatására, ugyan különböző mértékben, de megváltoztak a vad típusú törzshöz képest. A HMG-KoA reduktáz másodlagos metabolitok bioszintézisében betöltött szerepe régóta ismert és tanulmányozott a különböző organizmusokban. *H. volcanii* archaea baktériumnál megfigyelték, hogy az optimálisnál magasabb sókoncentráció mellett tenyésztve a baktériumot, nőtt a HMG-KoA reduktáz aktivitás és ezzel párhuzamosan a sejtmembrán lipid és karotinoid tartalma is (Bidle és mtsi. 2007). Karotin termelő *C. utilis*-ben növelve a *hmgR1* gén kópiaszámát sikerült túlműködtetni a MEV útvonalat és fokozni a karotin produkciót. Hasonló eredményt értek el karotinoidot termelő *S. cerevisiae*-ben is (Verwaal és mtsi. 2007), ahol a HMG-KoA reduktáz kópiaszám-emelésének hatására nőtt a termelődött karotinoid mennyisége. Az eredményeink arra utalnak, hogy a *M. circinelloides*-ben zajló karotinoid bioszintézisben mind a *hmgR2*, mind a *hmgR3* szerepet játszik.

6.4.6. Apoptotikus folyamatok detektálása

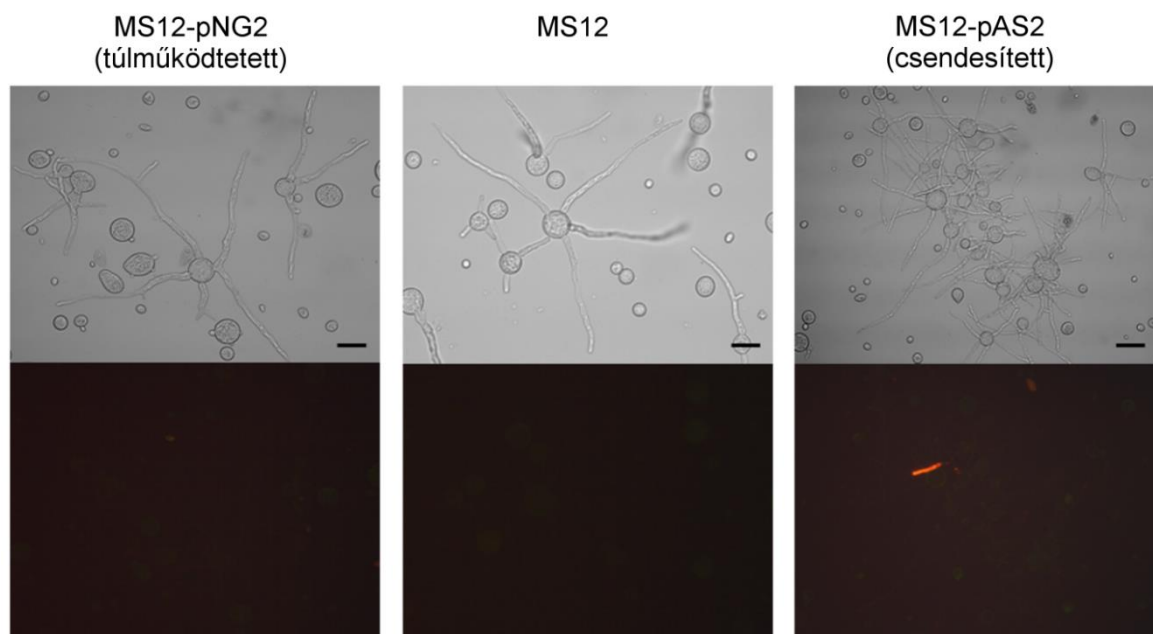
A *hmgR* gének csendesítésének hatására, különösen a *hmgR3* esetében, az ergoszterin szint csökkent, a spórák csírázási ideje kitolódott, a gombatörzsek növekedése lelassult, megváltozott a telepek makromorfológiája és a fénymikroszkópos vizsgálatok során plazmakiáramlásokat és megduzzadt hifákat láthattunk. Mindezen változások fényében megvizsgáltuk, hogy nem játszódik-e le a transzformánsokban apoptózis jellegű folyamat. A vizsgálathoz Annexin V-FITC festéket és propídium-jodidot alkalmaztunk. Az annexin V a plazmamembránon kifelé forduló foszfatidil-szerinhez képes kötődni és zöld fluoreszcens fényrel az apoptózis korai fázisát detektálja, míg a propídium-jodid a sejtmagmembrán dezorganizációját követően a DNS-t köti és piros fluoreszcens fényt bocsájt ki, ezzel jelezve a nekrozist. A törzseket 25 °C-on YNB tápoldatban neveltük. A festéshez a leoltástól számított 8. órában vettünk mintákat.



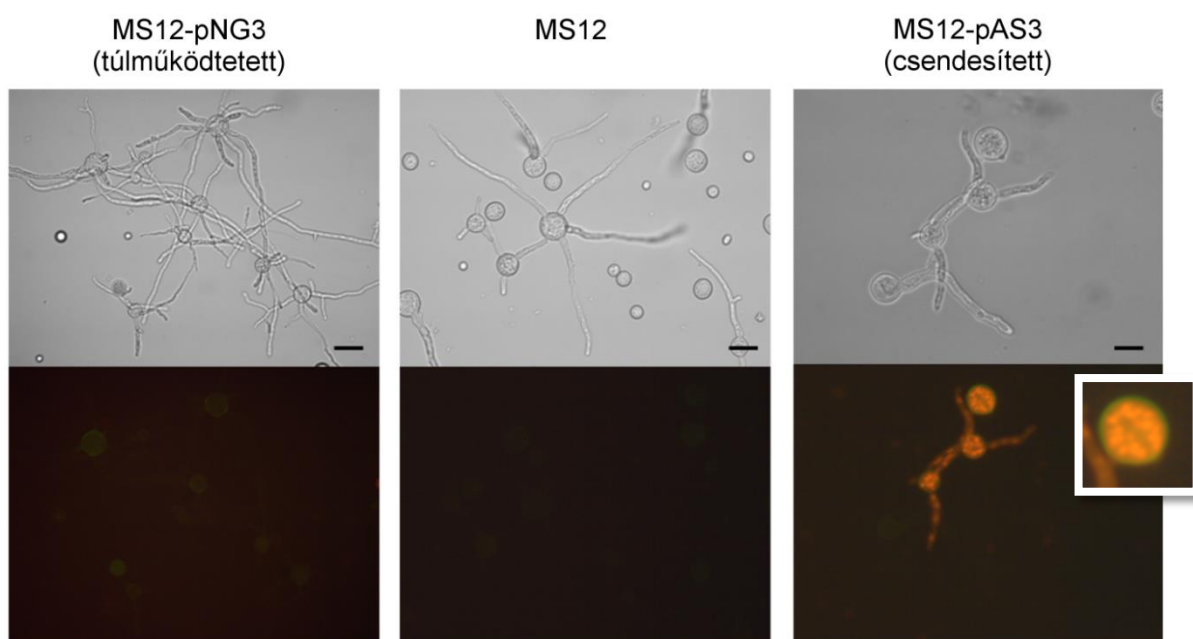
34. ábra. Az MS12, MS12-pNG1 és MS12-pAS1 izolátumok fénymikroszkópos és fluoreszcens. mikroszkópos képe az apoptózist detektáló festést követően. A méretskála 10 μm -nek felel meg.

A *hmgR1* géntúlműködtetésének és csendesítésének hatására nem tapasztaltunk jelentősebb változást a gomba növekedésében, ergoszterin és karotin termelésében, azonban a makromorfológiai vizsgálatok során, mindkét esetben plazmakiáramlásokat fedeztünk fel. A festést követően mind a pNG1, mind a pAS1 vektort hordozó transzformánsok esetében találtunk propídium-jodid pozitív hifaszakaszokat, azonban annexin V pozitívokat nem (34. ábra). A plazmakiáramlások a citoplazmamembrán integritásának megváltozására, sérülésére utalnak, ami miatt a sejtekben beindulhatnak nekrotikus folyamatok és sejtpusztulás. Az MS12 esetében sem annexin V, sem propídium-jodid pozitív sejteket nem találtunk.

Megvizsgálva az MS12-pNG2 és MS12-pAS2 transzformánsokat azt tapasztaltuk, hogy a *hmgR2* gén túlműködtetésének hatására nem következik be apoptotikus folyamat a sejtekben. Sem a korai apoptózist, sem nekrozist nem detektálunk ezekben az izolátumokban. A gén csendesítésének hatására kis mennyiségben ugyan, de előfordultak nekrotikus (propídium-jodid pozitív) hifák (35. ábra).



35. ábra. Az MS12, MS12-pNG2 és MS12-pAS2 izolátumok fénymikroszkópos és fluoreszcens mikroszkópos képe az apoptózist detektáló festést követően.
A méretskála 10 μm -nek felel meg.



36. ábra. Az MS12, MS12-pNG3 és MS12-pAS3 izolátumok fénymikroszkópos és fluoreszcens mikroszkópos képe az apoptózist detektáló festést követően.
Fehér keretben kiemelve az annexin V pozitív sejt. A méretskála 10 μm -nek felel meg.

A *hmgR2* génhez hasonlóan a *hmgR3* gén túlműködtetése során nem tudtunk detektálni korai vagy kései apoptózist, azonban a gén csendesítésének hatására, ahogy a 36. ábrán is látható megjelentek az annexin V – propidim-jodid pozitív sejtek és hifák. Ezeknél a mutánsoknál igen nagyszámban találtunk nekrotikus sejteket, mely fokozott sejtpusztulásra utaltak.

Gombák esetében a RAS fehérjének mind pro-, mind anti-apoptotikus hatását kimutatták (Ramsdale 2006). A RAS fehérje a kis GTPázok családjába tartozik és részt vesz a sejtek proliferációjában, differenciációjában és az apoptotikus folyamatokban. A fehérje prenilációjának gátlása révén gombákban és humán rákos sejtvonalakban is apoptózis indukálódott. Különböző karcinóma sejtekben a HMG-KoA reduktáz gátlása ER stressz választ váltott ki, mely apoptózishoz vezetett (Joo és Jettem 2010). Mivel a HMG-KoA reduktáz az izoprén bioszintézis korai szakaszának központi lépését katalizálja, ezért a gén csendesítése és az enzim szelektív gátlása kihat a különböző izoprén termékek szintézisére, így az egyes fehérjék funkciós csoportját adó farnezil képzésére is. Emlős és gomba sejtekben a RAS fehérje prenilációjának indirekt gátlása révén csökkent a RAS fehérje termelődés. *M. racemosus* esetében a RAS fehérjék érésének gátlása révén csökkent a gomba növekedése és a sporangiospórák kialakulásának mértéke, mely változások a gombasejtekben apoptotikus folyamatokat indukáltak (Roze és Linz 1998). A fenti eredmények tekintetében feltehető, hogy a *hmgR3* részt vesz ezen vagy más fehérjék prenil csoportjainak kialakulásában és így működésének gátlása apoptotikus folyamatokat indukálhat.

M. circinelloides esetében a *hmgR1* gén túlműködtetésének és csendesítésének hatására nekrotikus hifaszakaszokat azonosítottunk, mely változás azt mutatja, hogy ezekben a sejtekben a sejtmagmembrán dezorganizálódott és az adott hifaszakasz elhalt. A *hmgR2* túlműködtetése nem, de a gén csendesítése hatására szintén nekrotikus hifaszakaszokat tudtunk detektálni. A két gén esetében a mutánsokban azonban nem tudtuk kimutatni a korai apoptózist. A *hmgR3* gén túlműködtetésének hatására sem indukálódott apoptózis a mutánsokban, azonban a gén csendesítésének hatására az apoptózis korai és kései fázisát is detektálni tudtuk. A plazmakiáramlások, a gombatelep szektorozottsága, az ergoszterin tartalom csökkenése és a korai apoptózis, valamint a nekrozis detektálása arra engednek következtetni, hogy a HmgR3 szerepet játszhat a sejtek proliferációjában és az apoptotikus folyamatokban.

6.4.7. A mutáns törzsek sztatinokkal szembeni érzékenységének vizsgálata

A sztatin érzékenység vizsgálatot 96 lyukú mikrotiter lemezen végeztük, melyet 25 °C-on inkubáltunk 3 napon keresztül. A vizsgálathoz atorvasztatint, rozuvasztatint és fluvasztatint használtunk. A 6. táblázatban a 48. órában mért OD értékekből számolt MIC₉₀ értékek láthatóak. A kísérlet során transzformációnként 2-2 transzformáns telepet vizsgáltuk, 3 párhuzamosban.

6. táblázat. A transzformáns törzsek és az MS12 sztatinnal szembeni minimális gátlókoncentrációja (MIC₉₀).

	fluvasztatin (µg/ml)	atorvasztatin (µg/ml)	rozuvasztatin (µg/ml)
MS12	4	16	32
MS12-pNG1	4	16	32
MS12-pAS1	4	16	32
MS12-pNG2	32	256	>256
MS12-pAS2	4	16	32
MS12-pNG3	64	>256	>256
MS12-pAS3	4	16	32

A táblázatokban 3 egymástól független mérés eredményeinek átlagát tüntettük fel.

A fluvasztatin MIC₉₀ értéke MS12 esetében 4, az atorvasztatiné 16, míg rozuvasztatiné 32 µg/ml értéknek bizonyult. Az eredményekből látszik, hogy a három sztatin közül a fluvasztatin gátolta legjobban az izolátumokat, míg a rozuvasztatin a legkevésbé. A *hmgR1* gén csendesítésének vagy kópiaszámának emelése nem befolyásolta a transzformáns törzsek sztatinnal szembeni érzékenységét (6. táblázat).

A *hmgR2* gén csendesítésének hatására nem változott a transzformáns törzsek sztatinnal szembeni érzékenységük a vad típusú törzshöz képest (6. táblázat). A gén kópiaszámának emelésére az MS12-pNG2 mutánsok sztatinnal szembeni érzékenysége csökkent. Fluvasztatin esetében 4 µg/ml-ről 32 µg/ml-re, atorvasztatin esetében 16 µg/ml-ről 256 µg/ml-re, míg rozuvasztatin esetében 32 µg/ml -ről több, mind 256 µg/ml-re emelkedett a sztatin koncentráció, mely gátolta a gomba növekedését.

A *hmgR3* gén esetében hasonló eredményeket kaptunk, mint a *hmgR2*-nél. A gén csendesítésének hatására nem változott a transzformáns izolátumok sztatinnal szembeni érzékenysége, míg a gén túlműködtetésének hatására a mutánsok sztatinnal szembeni érzékenysége csökkent. Ez az érzékenység csökkenés azonban jelentősebb volt, mint az előző gén esetében. A 6. táblázatban látható, hogy az MS12-pNG3 transzformánsok MIC₉₀ értéke a fluvasztatin esetében 4 µg/ml-ről 64 µg/ml-re, atorvasztatin és rozuvasztatin esetében pedig, 16 illetve 32 µg/ml-ről több mint 256 µg/ml-re változott.

A *Trichoderma harzianum hmgR* génjének csendesítése során (Cardoza és mtsi. 2006) a gomba érzékenyebbé vált a lovasztatinnal szemben, valamint kevesebb ergoszterin

termelésére volt képes (Cardoza és mtsi. 2007). A *M. circinelloides hmgR* génjeinek csendesítése során a transzformáns törzsek sztatín érzékenysége ugyan nem változott, azonban a *hmgR2* és *hmgR3* csendesített mutánsok karotinoid és ergoszterin tartalma jelentősen lecsökkent (6.4.5. fejezet).

Az jól ismert, hogy a sztatínok a HMG-KoA reduktáz szelektív gátlószerei, melyeket a humán gyógyászatban koleszterinszint csökkentő gyógyszerként alkalmaznak, azonban humán patogén gombákkal szembeni antifungális hatásuk igen intenzíven kutatott terület (Chamilos és mtsi. 2006 ; Qiao és mtsi. 2007; Galgóczy és mtsi. 2009, 2010). A HMG-KoA reduktáz gátlása révén *M. racemosus*-ban apoptózis-szerű folyamatok indukálódtak lovasztatin kezelés hatására. Lukács és munkatársai (2009) klónozták a *R. miehei* HMG-KoA reduktázát, melyet *M. circinelloides*-ben expresszáltattak. Az így kapott transzformánsok sztatínokkal szembeni érzékenysége ugyan lecsökkent, azonban a törzsek karotinoid tartalma nem változott. *M. circinelloides* esetében, mi azt az eredményt kaptuk, hogy mind a *hmgR2*, mind a *hmgR3* túlműködtetésének hatására nőtt a transzformánsok karotin tartalma és csökkent a sztatínokkal szembeni érzékenységük, azonban *hmgR1* esetében ilyen változást nem tapasztaltunk.

Sch. pombe és *Ustilago maydis* HMG-KoA reduktázának katalitikus régiója nagyfokú hasonlóságot mutat a humán HMG-KoA reduktáz katalitikus régiójával, így kiváló modell új antifungális szerek teszteléséhez (Andrade-Pavón és mtsi. 2013). A *hmgR2* és *hmgR3* gén túlműködtetésének hatására a gomba sztatínokkal szembeni érzékenysége jelentősen csökkent, ami azt jelzi, hogy ugyancsak kiváló terápiás célpontok lehetnek, új gombaellenes szerek kifejlesztése során.

6.4.8. A *hmgR* gének funkcionális vizsgálatának legfontosabb eredményei

A gének túlműködtetésével és csendesítésével kapott eredményeket a következőképpen foglalhatjuk össze: a *hmgR1* gén túlműködtetésének és csendesítésének hatására nem tapasztaltunk jelentős változásokat. A transzformánsok esetében mind két esetben plazmakiáramlásokat és nekrotikus hifákat találtunk, mely azt sugallja, hogy a *hmgR1* megváltozott működése kihatással van a plazmamembrán integritására. A *hmgR2* gén overexpressziója hatással volt a gomba karotin és ergoszterin tartalmára, míg a gén csendesítése plazmakiáramlásokat, nekrotikus hifákat és ergoszterin tartalom csökkenést eredményezett. Eredményeink arra utalnak, hogy a HmgR2 az általános izoprén bioszintézis útvonalban vehet részt. A *hmgR3* kópiaszámának emelése a gomba karotin tartalmát jelentősen megnövelte, míg a sztatínokkal szembeni érzékenység jelentősen lecsökkent. A

gén csendesítésének hatására a transzformáns telepek növekedése lelassult, a telep morfológiája megváltozott és a hifák szabálytalanná váltak, amihez plazmakiáramlások is társultak. Ezekben a transzformánsokban apoptózisszerű folyamatokat is sikerült detektálni. Feltehetőleg a HmgR3 a HmgR2-vel átfedve felelős a karotin és ergoszterin bioszintéziséért. Emellett az előbbinek specifikus szerepe van a gomba morfogenezis és növekedés során, valamint az apoptotikus folyamatokban.

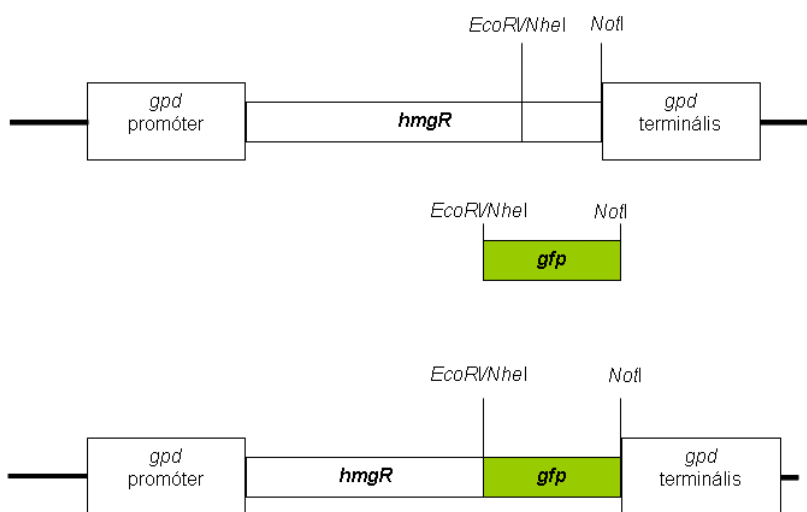
6.5. A HMG-KoA reduktázok sejten belüli lokalizációjának vizsgálata

Az egyes HmgR fehérjék funkciójának jobb megismerése céljából szükséges a fehérjék sejten belüli lokalizációjának meghatározása. A *S. cerevisiae* Hmg1p fehérje az ER sejtmag felőli részén helyezkedik el (Koning és mtsi. 1996) és részt vesz az ER membrán proliferációjában (Basson és mtsi. 1988), ezzel szemben a Hmg2p az ER membrán periferiáján, a citoplazma felőli oldalon lokalizálódik, és fontos szerepe van az oxigénérzékelésben. *Saccharomyces* Hmg1p-t túlműködtetve beindul az ER sejtmag felőli membránrendszerének az úgynevezett *karmelle*-nek a proliferációja. Emlős sejtekben a HMG-KoA reduktáz gátlása révén az ER-ben stresszválasz indukálódik, mely apoptózishoz vezet (Joo és Jetten 2010). A *Mucor* reduktázok sejten belüli lokalizációjának vizsgálata arra is választ adhat, vajon a különböző izoprénvázas vegyületek egymástól független, külön kompartmentben szintetizálódnak-e a sejten belül. *P. blakesleeanus*-ban és *B. trispora*-ban megfigyelték a különböző izoprén származékok szintézisének kompartmentalizációját (Bejarano és mtsi. 1992; Kuzina és mtsi. 2006). Az ubikiinon és ergoszterin azonos, míg a karotinoidok külön kompartmentben szintetizálódnak, már az acetyl-koenzim A-tól kezdődően (Bejarano és mtsi. 1992; Kuzina és mtsi. 2006). Emlősökben HMG-KoA reduktáz az ER-ben és a peroxiszómában lokalizálódik, azonban a szterinek és az ubikiinon szintézise itt is elkülönül (Breitling és mtsi. 2002).

A HMG-KoA reduktázok sejten belüli lokalizációjának vizsgálatához a reduktázokat zöld fluoreszcens fehérjével (GFP) fuzionáltattuk. A zöld fluoreszcens fehérjét 1961-ben fedezték fel (Shimomura 1962) és azóta is a különböző biológiai folyamatok vizsgálatának egyik fontos eszköze. Más riporter fehérjékkel ellentétben nagy előnye, hogy nem igényel további szubsztrátot a fehérje az *in situ* megfigyelésekhez. A GFP egy 286 aminosavat tartalmazó 26,9 kDa tömegű fehérje, melyet kék (545 nm) vagy UV fénnel (395 nm) gerjesztve zöld (508 nm) fluoreszcens fényt bocsájt ki (Tsien 1998). Járomspórás gombákban eddig csak két fajban használták a *gfp*-t, mint riporter gént. A *glauca*-ban a *gfp*-t génexpressziós vizsgálatban alkalmazták (Schilde és mtsi. 2001). Autonóm replikatív

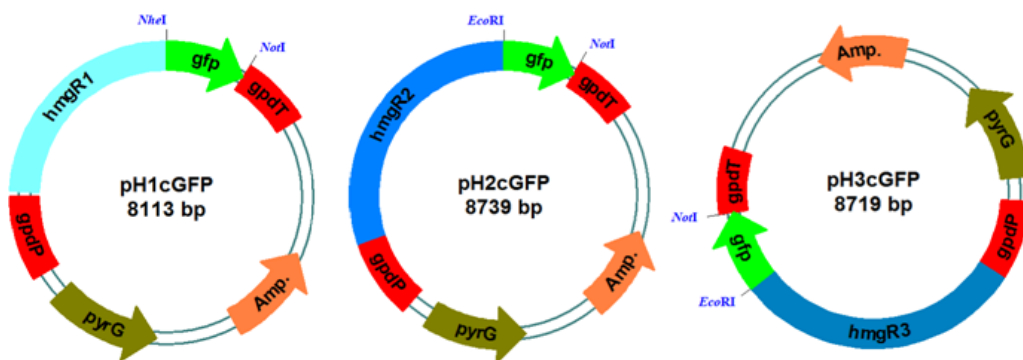
plazmidot alkalmazva, azt tapasztalták, hogy különböző szektorok alakultak ki a transzformálás után, melyek hordozták vagy elvesztették a bejuttatott plazmidot. *Backusella lamprospora*-ban az *Agrobacterium tumefaciens* közvetített transzformáció sikerességének nyomon követésére alkalmazták a GFP-t (Nyilasi és mtsi. 2008).

A fúziós fehérjék összeépítéséhez a már említett pNG1, pNG2 és pNG3 vektorokat (21. ábra) használtuk fel. Ezen vektorokon kívül rendelkezésünkre állt a laborunkban korábban létrehozott pPT43-*gfp* vektor is, mely a *gfp* gént a *Mucor gpdP* és *gpdT* szakaszok között hordozta. A pNG vektorokban található *hmgR* géneket a *hmgR1* esetében *NheI*-*NotI*, míg a *hmgR2* és *hmgR3* gén esetében *EcoRI*-*NotI* endonukleázokkal emésztettük, ezáltal csonkoltuk a gének azon szakaszát, mely a fehérje katalitikus aktivitásért felelős régióját kódolja (37. ábra).



37. ábra. A HmgR fehérjék sejten belüli lokalizációjának vizsgálatára alkalmas vektorok építésének folyamatábrája.

Az endonukleázokkal történt emésztés után a *gfp*-t ligálás útján összeépítettük a reduktáz gének azon szakaszával, mely a fehérjék transzmembrán régióját kódolja, lecserélve a katalitikus régiót kódoló génszakaszt. Az összeépítés során ügyeltünk a leolvasási keret sértetlenségére. A fúzióhoz használt aminosav szakaszok a következők voltak; HmgR1 esetében 1-553 as, a HmgR2 esetében 1-756 as, míg a HmgR3 esetében 1-825 as. Ezzel a módszerrel létrehoztuk a pH1cGFP, pH2cGFP és a pH3cGFP vektorokat (38. ábra). A *gfp*-t minden esetben szekvenálással ellenőriztük.



38. ábra. A HmgR fehérjék lokalizációjának vizsgálatához épített vektorkonstrukciók.

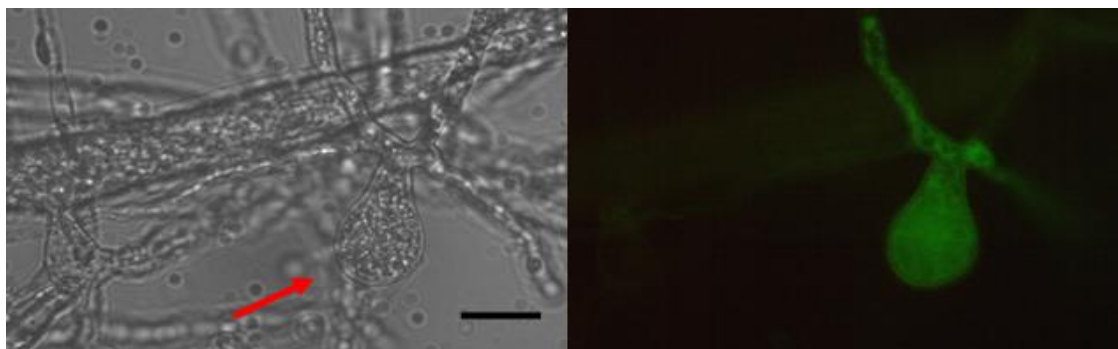
A fehérjék transzmembrán régiója nem sérült meg, így a sejten belül az egyes reduktáz fehérjének megfelelő membránrendszerbe tudnak beépülni, a GFP-vel pedig a fehérje lokalizációja sikeresen nyomon követhető. A vektorokkal sikeres PEG-mediált protoplaszt transzformációt hajtottunk végre, majd a transzformálást követően 10-10 transzformáns telepet izoláltunk. A transzformánsok a plazmidokat autonóm replikatív elemként tartják fenn. Az izolátumok közül transzformációnként kiválasztottunk 1-1 transzformáns telepet (MS12-pH1cGFP-1, MS12-pH2cGFP-1 és MS12-pH3cGFP-1) és megkezdjük azok vizsgálatát. Fluoreszcens mikroszkóp felhasználásával, valamint DNS és RNS izolálást követően PCR-rel is igazoltuk a *gfp* jelenlétét a transzformánsokban és megkezdjük azok elemzését.

6.5.1. A vektor konstrukciókat hordozó transzformánsok vizsgálata

A transzformánsok ellenőrzését fluoreszcens mikroszkóppal is elvégeztük, azonban a GFP-t expresszáló hifák aránya alacsonynak bizonyult, ezért a plazmidokat hordozó spórák számának dúsítása érdekében monosporangialis telepeket képeztünk szelektív körülmények mellett. A vektorok *gpd* promótert tartalmaztak, amely glükózzal indukálható, így a fúziós fehérje kifejeződésének elősegítése érdekében 3%-ra növeltük a tápoldat glükóz tartalmát. Ebben a 3% glükózt tartalmazó tápoldatban ráztattuk a telepeket 4 napon keresztül és folyamatosan figyeztük a GFP pozitív sejtek megjelenését. A leoltástól számított 2. napon volt a legmagasabb a GFP-t expresszáló sejtek aránya.

MS12-pH1cGFP-1

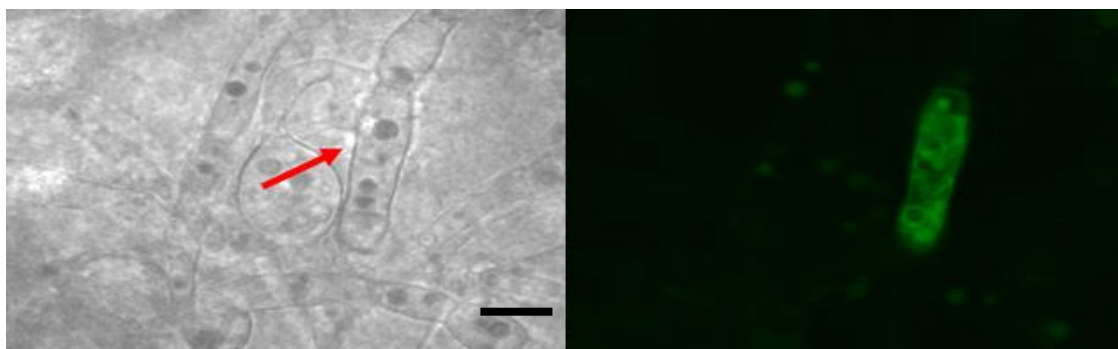
Az MS12-pH1cGFP-1 izolátum esetében a dúsítást követően is igen kis számban jelentek meg a GFP-t expresszáló sejtek. A glükózzal történő indukciót követően ezen sejtek aránya nem nőtt, azonban a 39. ábrán látható, hogy a GFP a sejten belül egy nagy kiterjedésű organellumban van jelen.



39. ábra. Az MS12-pH1cGFP-1 izolátum fény és fluoreszcens mikroszkópos felvétele.

Piros nyíl jelöli a GFP pozitív sejtet. A méretskála 10 μm -nek felel meg.

Megvizsgálva az izolátumot konfokális mikroszkóppal is (40. ábra), hasonló megállapításra jutottunk, miszerint a GFP jelölt fehérje egy nagy kiterjedésű organelumban van jelen. Mind két ábrán látható, hogy nem mindegyik sejtben fejeződik ki a GFP, annak ellenére, hogy szelektív körülmények között történt a mintaelőkészítés.



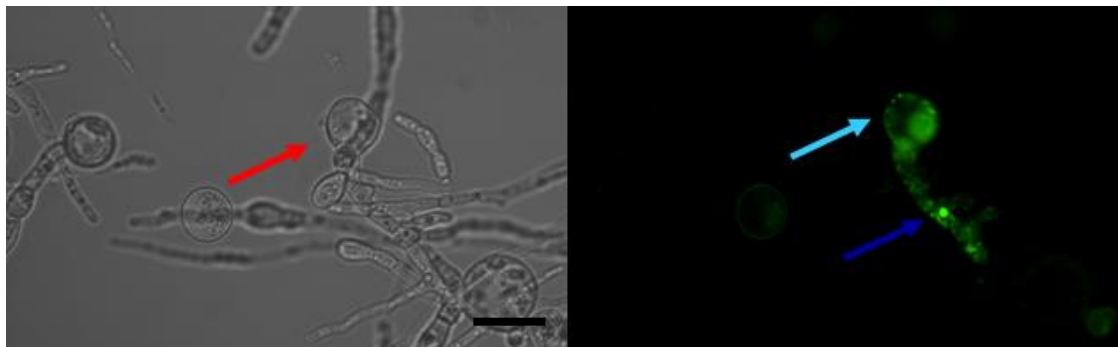
40. ábra. Az MS12-pH1cGFP-1 izolátum konfokális mikroszkópos felvétele.

A piros nyíl mutatja a GFP-t hordozó sejtet. A méretskála 20 μm -nek felel meg.

A vizsgálataink során az MS12-pH1cGFP vektort hordozó transzformánsok esetében GFP jelet csak spórákban és csíratömlőben tudtunk detektálni, kifejlett hifákban viszont nem. A sejten belül a GFP nagy kiterjedése arra enged következtetni, hogy egy összefüggő membránrendszerben lokalizálódik a HmgR1, mely valószínűleg az ER.

MS12-pH2cGFP-1

Az MS12-pH2cGFP-1 izolátum esetében fluoreszcens mikroszkóp segítségével a sejten belül nagyobb és kisebb méretű régiókat tudtunk azonosítani, melyekben felhalmozódik a HmgR2':GFP fehérje (41. ábra).

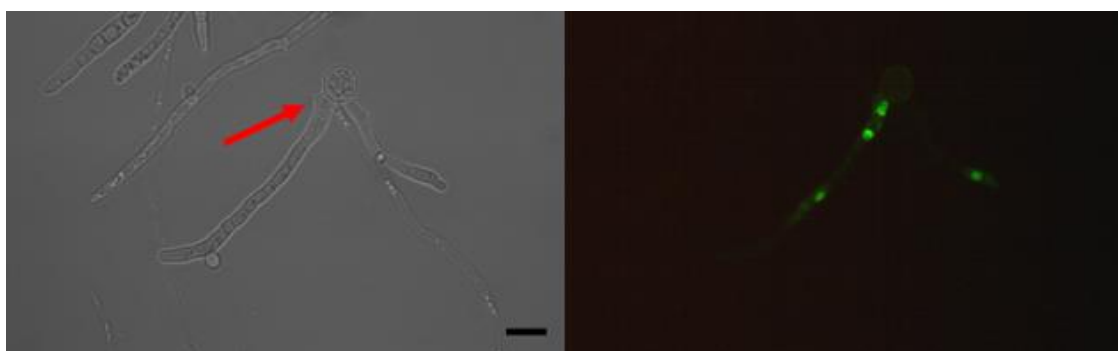


41. ábra. Az MS12-pH2cGFP-1 izolátum konfokális mikroszkópos felvétele.

A piros nyíl mutatja a GFP-t hordozó sejtet, a sötétkék nyíl a nagyméretű, míg a világoskék a kisméretű sejtorganelumot mutatja. A méretskála 20 μm -nek felel meg.

MS12-pH3cGFP-1

Az MS12-pH3cGFP mutánsok esetében szintén találtunk olyan hifákat, melyekben kifejeződik a HmgR3':GFP fehérje. A 42. ábrán látható, hogy a sejten belül a GFP nagyméretű régióban jelent meg, ellentétben a HmgR2':GFP fehérjével. Ahogy azt korábban írtam, ezeknél a mutánsoknál sem tudtuk elérni azt, hogy minden hifában kifejeződjön a GFP-vel fuzionáltatott fehérje, azonban a további vizsgálatokhoz a dúsítás elegendőnek bizonyult.



42. ábra. Az MS12-pH3cGFP-1 izolátum konfokális mikroszkópos felvétele.

A piros nyíl mutatja a GFP-t hordozó sejtet. A méretskála 20 μm -nek felel meg.

Annak érdekében, hogy indukáljuk a *gpd* promótert és a mikroszkópos vizsgálatokhoz szükséges mértékben kifejeztethessük a GFP-fúziós fehérjéket, megemeltük a táptalaj glükóz tartalmát. Ennek következtében azonban, legalábbis elvileg, nagy mennyiségben termelődhetnek a GFP fúziós fehérjék a bejuttatott plazmidokról. Ezért annak a kiderítésére, hogy a megtermelődött fehérje nem az ER lumenjében halmozódik fel, illetve nem degradálódik, hanem a sejten belül akár az ER, akár valamely más organelum membránjába ágyazódik, ultracentrifugálással membránfrakciót izoláltunk. A membránfrakció mikroszkópos vizsgálata igazolta a GFP jelenlétét membránban. Emellett fluoriméteres analízissel megállapítottuk, hogy a pH2cGFP és pH3cGFP mutánsok esetében

a tisztított membránfrakció fluoreszcenciája a kontroll törzsből tisztított mintához képest 66 és 87%-os emelkedést mutatott, míg a szolubilis frakcióból egyik esetben sem sikerült fluoreszcenciát kimutatnunk.

6.5.2. Kolokalizációs vizsgálatok az endoplazmatikus retikulummal és mitokondriummal

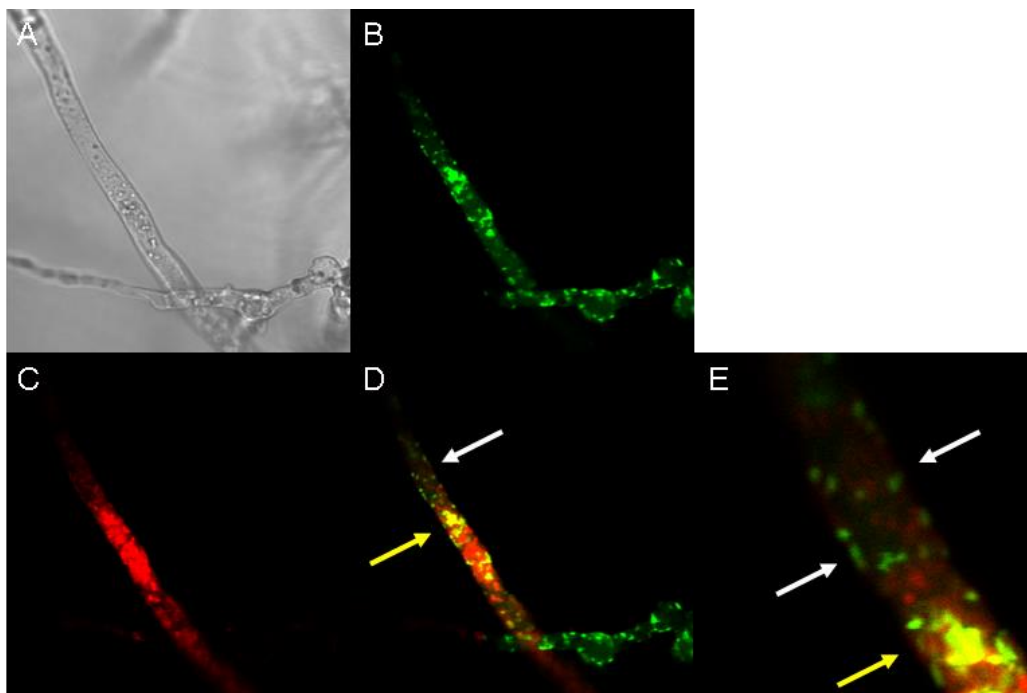
Fluoreszcens mikroszkóppal megvizsgálva az egyes mutáns törzseket, azt feltételeztük, hogy a nagy kiterjedésű GFP jelet mutató organelleum valószínűleg ER, ugyanis a HMG-KoA reduktázok főként az ER membránjához horgonyzódnak (Liscum és mtsi. 1985; Basson és mtsi. 1986; Learned és mtsi. 1989; Friesen és Rodwell 2004; Lombard és Moreia 2011). Ennek a kiderítéséhez ER festést végeztünk ER-Tracker Red fluoreszcens festék felhasználásával, amely képes az élő sejtet festeni. A festék rendkívül érzékeny, mivel a benne található glibenklamid az ER specifikus ATP-szenzitív kálium csatornák szulfonurea receptoraihoz képes kapcsolódni (Hambrock és mtsi. 2002). A vizsgálatok során az is kiderült, hogy a HmgR2':GFP a sejten belül egy kisebb méretű, fluoreszcens mikroszkóppal pontszerűnek látszó kompartmentben is felhalmozódik. *H. werneckii* esetében a HMG-KoA reduktáz az ER-en kívül a mitokondriumban is előfordulhat (Vaupotič és mtsi. 2007), ezért célszerűnek gondoltuk a mitokondriumok festésének elvégzését is. A mitokondriumok festését MitoTracker Red FM fluoreszcens festék használatával végeztük. Ez a festék is képes az élő sejtekbe bejutni és nem szükséges a minták fixálása sem. A MitoTracker Red FM képes a sejthártyán passzívan átjutni a membránpotenciáltól függően. A mitokondriumba jutva, az ott lejátszódó oxidációs folyamatok során a festékben található tiol-reaktív molekulacsoportnak köszönhetően az eredetileg fluoreszcens tulajdonsággal nem rendelkező festék fluoreszcenssé válik (Poot és mtsi. 1996). Annak ellenére, hogy mind két festék képes az élő sejteket festeni, a *Mucor* esetében ez nem volt teljesen igaz. A festési eljárás optimalizálása során többféle inkubációt kipróbálva sikerült elérnünk, hogy a minták közel 50%-a megfestődjön. A festés során a mintákat PBS oldattal mostuk, majd 30 percen keresztül 37 °C-on sötétben inkubáltuk. A munkát megnehezíti, hogy a *Mucor* sejtfalán nehezen jutnak át a különböző festékek, valamint hogy a GFP-fúziós fehérjét a sejtek viszonylag kis százaléka expresszálta.

Az MS12-pH2cGFP és MS12-pH3cGFP mutánsok esetében azonban a dúsításnak köszönhetően a sejtek relatíve nagy százalékában kifejeződött a GFP, így el tudtuk végezni ezekkel a mintákkal a festéseket. A festést követően a jobb felbontás eredménye érdekében konfokális mikroszkópot alkalmaztunk a vizsgálatokhoz. Az MS12-pH1cGFP mutáns

esetében azonban még mindig kevés a GFP-t expresszáló sejtek aránya a mitokondrium és ER festéshez.

MS12-pH2cGFP-1

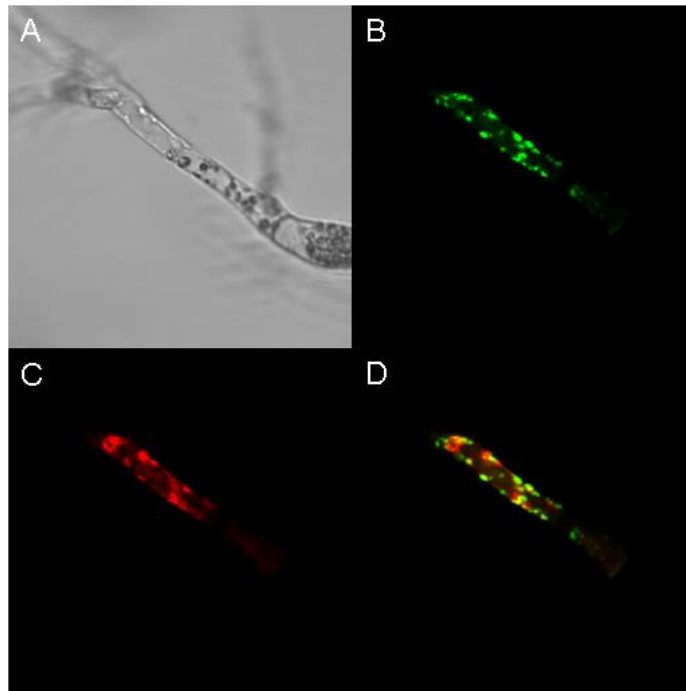
A 43. ábrán az MS12-pH2cGFP-1 transzformáns konfokális mikroszkóppal készített felvételei láthatóak az ER-Tracker Red festést követően.



43. ábra. Az MS12-pH2cGFP transzformáns ER-Tracker Red festést követő konfokális mikroszkóppal készített felvételei.

A: fénymikroszkópos kép, B: GFP, C: Er-Tracker Red festés, D: A GFP és az ER-Tracker Red festéssel készült kép egymásra helyezve, E: nagyított kép a pontszerű GFP-k lokalizációjáról. A sárga nyíl jelöli a kolokalizációt, míg a fehér nyíl jelöli a kisméretű GFP jeleket, melyek nem mutatnak kolokalizációt az ER-rel.

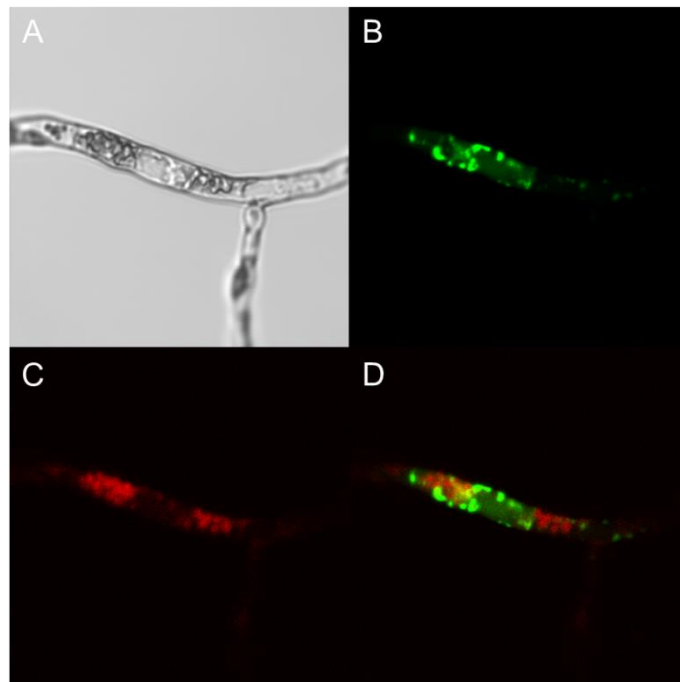
Fluoreszcens mikroszkóppal megvizsgálva az izolátumot azt tapasztaltuk, hogy a HmgR2':GFP fehérje a sejten belül két különböző méretű organellumban halmozódik fel (41. ábra). Ugyanezt a fajta felhalmozódást tapasztaltuk itt is. A 43B ábrán láthatunk nagyobb, összefüggő GFP jelet és kisebb, pontszerű GFP jelet is. A 43C képen a megfestett ER látható és amennyiben, ha erre rávetítjük a GFP-s képet (43D kép), akkor sárga színnel láthatóvá válik a kolokalizáció (sárga nyíl). Az Er-Tracker Red festést követően láthatóvá válik a kolokalizáció a HmgR2':GFP fehérje és az ER- között viszont, ahogy a 43E ábrán látható, a kis pontszerű régiók jól elkülönülnek az ER-től, nem mutatva azzal kolokalizációt. A 42D képen fehér nyíllal jelölt rész felnagyított ábrája látható, ahol jobban kivehetőek azok a kis pontszerű organellumok, melyek nem mutatnak kolokalizációt az ER-rel.



44. ábra. Az MS12-pH2cGFP transzformáns konfokális mikroszkóppal készített felvételei.

A: konfokális mikroszkópos kép, B: GFP, C: MitoTracker Red festés, D: A GFP és a MitoTracker Red festéssel készült kép egymásra helyezve.

A 44. ábrán ugyanennek az izolátumnak a MitoTracker Red festését követő konfokális mikroszkópos felvétele látható. A 44B képen a GFP, a 44C képen pedig a megfestett mitokondriumok láthatóak. A két kép egymásra vetítése (44D) után nem tapasztaltunk a HMGR2':GFP fehérje és a mitokondrium között kolokalizációt.



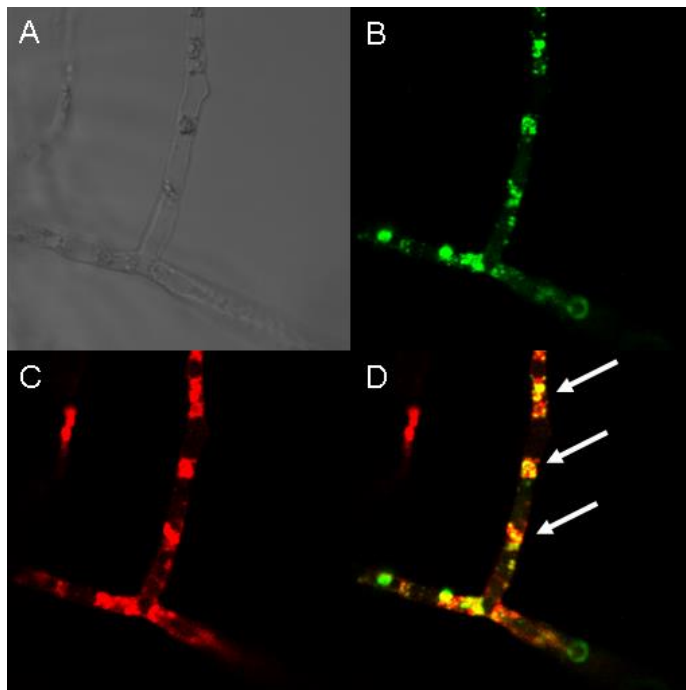
45. ábra. Az MS12-pH2cGFP transzformáns konfokális mikroszkóppal készített felvételei.

A; konfokális mikroszkópos kép, B; GFP, C; Nile red festés, D; A GFP és a Nile red festéssel készült kép egymásra helyezve.

Annak kiderítésére, hogy mik lehetnek azok az organellumok, ahol még megjelent a HMGR2':GFP fehérje, elvégeztük a sejten belüli lipidcseppek festését is Nile Red festék felhasználásával (45. ábra). A festék képes a sejten belül a neutrális lipidcseppeket megfesteni, melyek 550 nm hosszúságú fénnel gerjesztve piros fluoreszcenciát mutatnak. Hartman és munkatársai (2010) leírták, hogy a HMG-KoA reduktáz szterol indukálta áthelyeződését az ER-ből a citoplazmába lipid cseppek közreműködésével. A festést követően azonban a megfestett lipid cseppekkel sem mutatott kolokalizációt a HMGR2':GFP fehérje. Mivel a HMG-KoA reduktázok és az izoprén bioszintézis egyéb enzimei a peroxiszómákban is lokalizálódhatnak (Breitling és Krisans 2002), lehetséges, hogy a *M. circinelloides* esetében a HmgR2 fehérje peroxiszómálisan is jelen van. Ugyan akkor meg kell említeni, hogy a fehérje aminosav sorrendjének elemzése nem utalt lehetséges peroxiszómális szignálok jelenlétére.

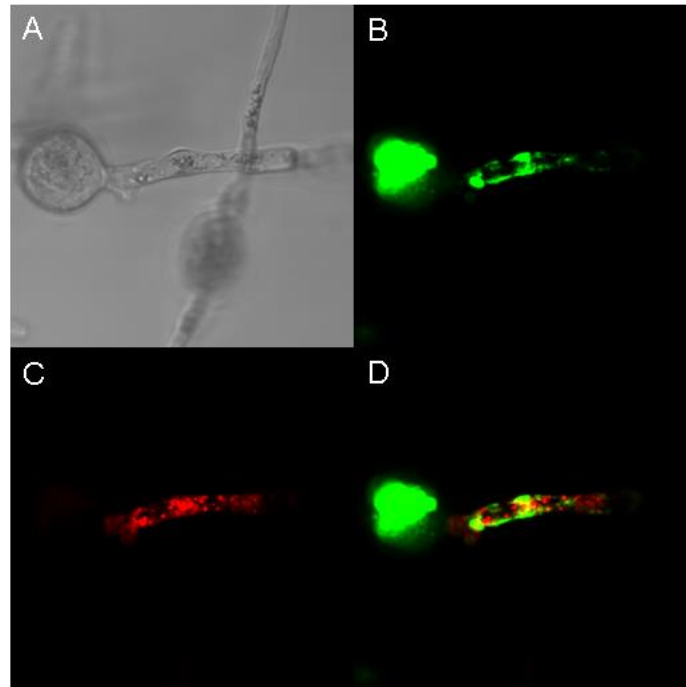
MS12-pH3cGFP-1

A konfokális mikroszkóppal végzett megfigyelések alapján, láthatóvá válik, hogy a HmgR3':GFP fehérje a sejten belül nagyméretű organellumokban halmozódik fel (46B kép). Egyúttal helyezve a GFP és ER festés során készített képeket láthatóvá válik a teljes kolokalizáció a fúziós fehérje és a sejtorganelum között, amit fehér nyilak jelölnek.



46. ábra Az MS12-pH3cGFP-1 izolátum konfokális mikroszkóppal készített felvétele
A:konfokális mikroszkópos kép,B: GFP, C: ER-Tracker Red, D: A GFP és az Er-Tracker Red festéssel készült kép egymásra helyezve. A fehér nyilak jelzik a kolokalizációt.

Ennél az izolátumnál is elvégeztük a mitokondriumok festését. A 47. ábrán a festést követő konfokális mikroszkóppal készített felvételek láthatóak. A 47D ábrán egymásra vetítve láthatóak a GFP és a Mito-Tracker Red festést követően készített felvételek.



47. ábra Az MS12-pH3cGFP-3 izolátum konfokális mikroszkóppal készített felvétele.

A: konfokális mikroszkópos kép, B: GFP, C: MitoTracker Red, D: A GFP és a Mito-Tracker Red festéssel készült kép egymásra helyezve

A konfokális mikroszkópos vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy a HmgR3 a sejten belül csak az ER-ben lokalizálódik, míg a HmgR2 megtalálható az ER-ben, ugyanakkor más kisebb méretű kompartmentekben is megtalálható. Annak érdekében, hogy kiderítsük, mik azok a kisméretű partikulumok a sejten belül, további vizsgálatokra van szükség. A fluoreszcens mikroszkóppal végzett megfigyelések továbbá arra engednek következtetni, hogy feltehetőleg a HmgR1 is az ER-ben horgonyzódik ki. Vizsgálataink során a HmgR1':GFP fehérje leginkább a leoltott spórákban és a csíratömlőkben jelent meg. *M. circinelloides* esetében a leoltástól számított 2. napon kezdődik a spórák termelődése és a sporangiumok kialakulása. A spórák számos mRNS-t és fehérjét tartalmaznak, hogy a csírázás és a csíratömlő képződés időpontjában biztosítani tudják a normális sejtműködést. Előfordulhat, hogy a HmgR1-nek a spórák képződésében van szerepe, azonban ennek pontos megállapításához további kísérletek szükségesek.

A lokalizációs vizsgálatokkal kideríthetjük, hogy a *Mucor*-ban is hasonló módon történik-e az egyes izoprén származékok szintézise, mint a *Phycomyces*-ben vagy a *Blakeslea*-ban. Annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy az egyes reduktázoknak van-e

specifikus szerepe a különböző izoprénok szintézisében hozzásegíthet ahhoz, hogy megfelelő támadáspontot adjunk különböző gombaellenes szerek kifejlesztésére vagy egy adott izoprén túltermelését lehetővé tevő törzs létrehozására. Mindezeken felül képet kaphatunk a *Mucor*-ban lejátszódó sejtbiológiai folyamatokról és a belső membránrendszerek kialakulásának folyamatáról is.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az terpének a természetben előforduló legnagyobb és legváltozatosabb vegyületcsoport. Ezen vegyületek olyan több szénatomos molekulák, melyek izoprén egységek összekapcsolódásával keletkeznek. Lehetnek hormonok, illetve hormonhatású vegyületek (pl. gibberellinek, szteroid hormonok), színyanyagok (pl. karotinoidok), sejtmembrán alkotók (pl. koleszterin, ergoszterin), illetve másodlagos anyagcseretermékek, mint a szeszkviterpének, vagy a szeszterterpének. A sejtekben is számos sejtbiológiai és biokémiai folyamat részét képezik. Részt vesznek az elektrontranszportláncban, a sejtek közötti kommunikációban és számos fehérje funkciós csoportját adják (pl. RAS). Bioszintézisük gombákban az úgynevezett mevalonsav útvonalon történik. Ezen útvonal során keletkezik az öt szénatomos izopentenil-pirofoszfát (IPP), mely az alapegységét képezi az összes izoprén származéknak.

A mevalonsav bioszintézis útvonal központi, sebesség-meghatározó lépése a 3-hidroxi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-KoA) átalakulása mevalonsavvá. Ezt a lépést a HMG-KoA reduktáz katalizálja, így ez az enzim közvetve számos biokémiai és sejtbiológiai folyamatban vesz részt. Fontos szerepe van a környezethez való alkalmazkodásban, az oxigénérzékelésben, egyes gombák esetében kihat a virulenciára és a morfogenezisre. A HMG-KoA reduktáz gén általában egy kópiában fordul elő a genomban, de vannak olyan élőlények, melyekben két vagy több izogén található. *S. cerevisiae*-ben két gént azonosítottak, melyekről két, funkciójában, szabályozásában és a sejten belüli lokalizációjában is eltérő fehérje íródik át. Általában az enzim az ER membránjába ágyazódik, de előfordulhat a mitokondriumban vagy a peroxiszómában is.

Munkánk során a fő célkitűzésünk a *M. circinelloides* HMG-KoA reduktáz génjeinek izolálása és jellemzése volt. Ezért a következő konkrét célokat tűztük ki és valósítottuk meg:

1. A *M. circinelloides* HMG-KoA reduktáz génjeinek izolálása és elemzése.

Munkánk elején a *P. blakesleeanus* és *R. miehei* *hmgR* génjével kerestünk homológiát mutató szekvenciákat a *Mucor* genom adatbázisban. Három olyan gént (*hmgR1*, *hmgR2* és *hmgR3*) azonosítottunk, amelyek nagyfokú hasonlóságot mutattak az ismert gomba *hmgR* génekkel. A géneket izoláltuk, majd meghatároztuk a cDNS szekvenciájukat. A *hmgR1* és *hmgR2* esetében 5 intront azonosítottunk, míg a *hmgR3* esetében csak kettőt. Elemeztük a kódolt fehérjék feltételezett aminosav szekvenciáit is. Mind három fehérje

tartalmazza az I. típusú reduktázokra jellemző két fő domént, a variábilis N-terminális régiót és a konzervált C-terminális régiót, valamint a kettőt összekötő, rövid szakaszt. Mindhárom feltételezett fehérjében azonosítottunk a NADPH- és HMG-KoA-kötő motívumokat, valamint szterol érzékelő domént (SSD). Utóbbi felelős a fehérje poszttranszlációs szabályozásáért. A HmgR1 esetében 6, a HmgR2 esetében 9, míg a HmgR3 esetében 5 transzmembrán hélixet azonosítottunk.

2. A *hmgR* gének kifejeződésének vizsgálata különböző tenyésztési körülmények között.

Valós idejű PCR segítségével vizsgáltuk a három *hmgR* gén kifejeződését különböző tenyésztési körülmények mellett. A vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a *hmgR1* transzkripciója aerob, a *hmgR3* transzkripciója anaerob körülmény között volt erősebb, míg a *hmgR2* mind két esetben erős kifejeződést mutatott. A *hmgR1* kifejeződése a hifákban volt jellemző és kifejeződésének maximumát a leoltástól számított 2. napon érte el. Az egyre növekvő hőmérsékletek hatására a kifejeződése folyamatosan csökkent, ezen kívül reagált a sóstresszre. A *hmgR2* és a *hmgR3* gének már a csírázó spórákban is aktívak. Szignifikáns hőmérsékletfüggést nem tapasztaltunk a két génnél. Mindkét gén kifejeződését gátolta a maltóz és a nátrium-acetát, mint egyedüli szénforrás. A *hmgR2* reagált leginkább a sóstresszre. Eredményeink azt mutatják, hogy a környezeti hatásokra a *hmgR2* átíródása változott leginkább.

3. A *hmgR* gének kópiaszámának emelése és a gének csendesítése.

A génekre alapozva, olyan vektorkonstrukciókat hoztunk létre, melyek segítségével megemeltük a gének kópiaszámát (pNG vektorok), illetve csendesítettük (pAS vektorok) azokat. A transzformáció során bejuttatott gének és génszakaszok megfelelő kifejeződése érdekében a *Mucor gpd* promóter és terminális régióját használtuk. A géncsendesítést antiszensz RNS alapú géncsendesítéssel valósítottuk meg. A létrehozott vektorokkal PEG-mediált protoplaszt transzformációt hajtottunk végre, majd a transzformáns telepeket izoláltuk. Megvizsgáltuk a transzformánsok növekedését, makro- és mikromorfológiáját, karotin és ergoszterin tartalmát és a sztatinnal szembeni érzékenységüket.

A *hmgR1* gén túlműködtetésének és csendesítésének hatására jelentős változást egyik vizsgált körülmény mellett sem tapasztaltunk. A transzformáns telepek mikromorfológiájának vizsgálata során plazmakiáramlásokat tudtunk detektálni, de megváltozott hifákat nem. A gén csendesítésének hatására az izolátumok ergoszterin

tartalma kismértékben csökkent a vad típusú törzshöz képest. Apoptózis festést követően, mindkét típusú transzformánsban azonosítottunk nekrotikus hifákat és sejteket. A *hmgR2* gén túlműködtetésének hatására nőtt a transzformánsok karotin és ergoszterin tartalmuk, valamint csökkent a sztatínokkal szembeni érzékenységük. A gén csendesítése szintén plazmakiáramlásokhoz vezetett, valamint csökkent az izolátumok ergoszterin tartalma is. Az esetleges apoptotikus folyamatok detektálása során itt is találtunk nekrotikus sejteket és hifarészeket. A legtöbb változást a *hmgR3* gén esetében tapasztaltuk. A gén kópiaszámának emelése hatására ezekben a transzformánsokban nőtt leginkább a karotinoid tartalom és csökkent a sztatínokkal szembeni érzékenység. A gén csendesítésének hatására a transzformánsok makromorfológiája szabálytalanná vált, a hifák megduzzadtak, a hifák elágazásainak száma megnőtt és számos plazmakiáramlást azonosítottunk. Az ergoszterin szint és a karotinoid szint jelentősen lecsökkent. Apoptózis festést követően az apoptózis korai fázisát és a nekrozist is ki tudtuk mutatni. A csendesített transzformánsok spóráinak csírázó képessége is megváltozott.

4. Az egyes HmgR fehérjék sejten belüli lokalizációja.

A *M. circinelloides* HMG-KoA reduktázainak sejten belüli lokalizációjának vizsgálatához a reduktázok transzmembrán régióit GFP-vel fuzionáltattuk. A fúziós fehérjék segítségével nyomon tudtuk követni a fehérjék sejten belüli lokalizációját. A létrehozott vektorokkal PEG-mediált protoplaszt transzformációt hajtottunk végre, majd a transzformáns telepeket izoláltuk. A transzformánsok elemzését fluoreszcens mikroszkópiával kezdtük meg, melynek során azt tapasztaltuk, hogy mindhárom fehérje a sejten belül egy nagyméretű organellumban lokalizálódik, illetve a HmgR2 emellett számos kisebb, jól körülhatárolható kompartmentben is megjelent. Ahhoz, hogy a fehérjék pontos lokalizációját meghatározzuk endoplazmatikus retikulum és mitokondrium festést alkalmaztunk, majd a festett mintákat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A HmgR2 és a HmgR3 a festéseket követően egyértelmű kolokalizációt mutatott az endoplazmatikus retikulummal, azonban a mitokondriummal nem.

Vizsgálataink során a következő fő hasonlóságokat és különbségeket azonosítottuk a *M. circinelloides* három *hmgR* génje között:

A *hmgR1* gén aerob körülmények között íródik át, csak a hifákban és a spóráképződés időszakában. A gén relatív transzkripciós szintje a *hmgR2*-nél és *hmgR3*-nál mért értékekhez viszonyítva igen alacsony, és csak ennél a génnél mutattunk ki

hőmérsékletfüggő transzkripciót. Anaerob körülmények között a gén aktivitása jelentősen lecsökken. A gén megváltozott működésének hatására (kópiaszámának emelése, csendesítése) a gomba karotinoid és ergoszterin termelése nem változott, ugyanakkor hatással lehet a citoplazma membrán integritására. A HmgR1 fehérje jellemzően a spórákban és csíratömlőben jelenik meg és feltehetőleg az endoplazmatikus retikulum membránjába ágyazódik.

A *hmgR2* gén aerob és anaerob tenyésztési körülmények mellett erős aktivitást mutatott, valamint relatív transzkripciós szintjét összehasonlítva a másik két gén értékeivel megállapítottuk, hogy az anaerob tenyésztést leszámítva e gén a legaktívabb a három reduktáz gén közül. A spórák csírázásának idején és az intenzív micéliumképzés során relatív transzkripciós szintje magas. A növekvő sókoncentráció változásával párhuzamosan nőtt a relatív transzkripciós szintje, azonban a szénforrások közül a trehalóz és a maltóz gátolta a kifejeződését. A gén túlműködtetésének hatására a transzformáns törzsek karotinoid és ergoszterin tartalma jelentősen megnőtt, ugyanakkor a sztatinokkal szembeni érzékenysége lecsökkent. Mivel a HMG-KoA reduktáz az ergoszterin bioszintézisben is központi jelentőséggel bír, a HmgR2 funkcionális vizsgálata hasznos lehet új, a patogén gombákkal szembeni szerek kifejlesztése és terápiás célpontok megtalálása szempontjából is. Az ergoszterin bioszintézis a gombaellenes terápiák egyik legfontosabb célpontja. Újabban HMG-KoA reduktáz gátlók alkalmazási lehetőségét is intenzíven kutatják (Galgóczy és mtsi. 2011). A gén csendesítésének hatására csökkent a karotinoid és ergoszterin mennyisége, valamint a citoplazma membrán integritásában is zavarok keletkeztek. A HmgR2 fehérje a sejten belül az endoplazmatikus retikulum membránjában helyezkedik el, azonban a konfokális mikroszkópos vizsgálatok nem zárják ki más, kisebb méretű kompartmentekben történő lokalizációját sem.

A *hmgR3* gén kifejeződését nagyban befolyásolja a környezet oxigéntartalma, ugyanis anaerob körülmények között megnő a gén relatív transzkripciós szintje. A gén terméke fontos a spórák csírázásának idején, valamint a spóráképződés időpontjában. Hőmérsékletfüggést, mint a *hmgR1* esetében, vagy szerepet az ozmotikusan megváltozott környezethez való adaptálódáshoz, mint a *hmgR2* esetében, nem találtunk. Leginkább e gén terméke befolyásolta a termelődő karotinoid mennyiséget és az ergoszterol bioszintézisre is hatással volt. A gén csendesítése csökkentette leginkább a termelődő ergoszterol tartalmat. A *hmgR3* és a *hmgR2* felhasználható a karotinod bioszintézis fokozására és esetleg egy, az iparban is alkalmazható karotinoidtermelő törzs létrehozására. A gén csendesítésének hatására a termelődő karotinoid mennyiség jelentősen lecsökkent, a gomba makro- és

mikromorfológiája megváltozott, valamint apoptotikus folyamatok játszódtak le a sejtekben. A spórák elvesztették csírázókéességüket és a csírázás ideje jelentősen kitolódott. A járomspórás gombákban lezajló apoptotikus folyamatokról igen keveset tudunk, emiatt a gén kiváló célpontja lehet az ezirányú kutatásoknak.

Kutatásaink nyomán új információval bővültek ismereteink a *M. circinelliodes*-ben zajló terpén bioszintézisről. Eredményeink hozzájárulhatnak a járomspórás gombák morfogenezisének, valamint a sejten belül lejátszódó apoptotikus és stresszválasz útvonalak felderítéséhez. Továbbá ezen eredmények felhasználhatóak a *Mucor*-ban zajló karotinoid és ergoszerin bioszintézis szabályozásának tanulmányozására, így hozzájárulhatnak az iparban is alkalmazható karotinoid termelő törzsek előállításához, valamint hatékony gombaellenes szerek kifejlesztéséhez. Vizsgálataink során sikeresen alkalmaztuk a GFP-t a reduktázok sejten belüli lokalizációjának vizsgálatához.

8. SUMMARY

Mucor circinelloides is a carotene producing zygomycete fungus, which has been used as a model organism in studies of the carotenoid biosynthesis. Terpenoids are one of the most diverse group of natural chemical compounds. They are synthesized from two or more isoprene units. They have different biological functions, such as hormones or hormone-like compounds (e.g. gibberellins in plants or steroid hormones in animals), colorants (e.g. carotenoids), cell membrane components (e.g. cholesterol and ergosterol) and several types of secondary metabolic products, among others di-, sesqui- or sesterterpenoids. In cells, they have role in different cell biological and biochemical processes. They can participate in the electron transport chain, in cell-cell communication and give functional groups of certain proteins (e.g. RAS). Isopentenyl pyrophosphate (IPP) is the basic building unit of all isoprene derivatives, which is synthesized via the mevalonic acid pathway.

The central, rate limiting step of this pathway is the conversion of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) to mevalonic acid, catalysed by the enzyme HMG-CoA reductase. Through to the formation of the many different terpenoids, HMG-CoA reductase has an important role in the adaptation to the environmental changes, virulence and morphogenesis. Usually only one HMG-CoA reductase gene occurs in the genome, but some organisms have two or more reductase genes. In the *S. cerevisiae* genome, two HMG-CoA reductase genes were identified with different functions, regulations and subcellular localizations. Generally, this enzyme is an endoplasmic reticulum-anchored protein, but it may also be present in the mitochondria or the peroxisomes.

The main goal of the present study was the isolation and characterization of the HMG-CoA reductase genes of *M. circinelloides*. Therefore, the following specific objectives were set and implemented:

1. Isolation and characterization of *M. circinelloides* HMG-CoA reductase genes.

Using the *hmgR* genes of *P. blakesleeanus* and *R. miehei*, searches for homologous sequences were performed in the genome database of *M. circinelloides* f. *lusitanicus*. Three *hmgR* genes (*hmgR1*, *hmg2* and *hmgR3*) were identified. The genes were isolated and their cDNA sequences were determined. In *hmgR1* and *hmgR2*, five introns were identified, while *hmgR3* had only two introns. We analysed the amino acid sequences of the putative proteins as well. All three proteins belong to type I reductases with two main domains, the variable

N-terminal region and the conserved C-terminal region. Between them, there is a short linker region. NAD(P)H and HMG-CoA binding motifs and the sterol sensing domain (SSD) could be identified in all three proteins. SSD is responsible for the post-translational regulation of proteins. In *hgmR1* one, in *hmgR2* nine, while in *hmgR3* five transmembrane helix were identified.

2. Analysis of the transcription of the *hmgR* genes under different growth conditions.

The relative transcription levels of the three *hmgR* genes were determined under various culture conditions by quantitative real-time PCR. It was found that *hmgR1* is transcribed only under aerobic conditions. At the same time, the transcription level of *hmgR3* was relatively high under anaerobiosis, while *hmgR2* showed high transcription under both conditions. Expression of *hmgR1* was detected only in the hyphae and reached the maximum level at 48 hours after inoculation showing a temperature-dependent transcription.

In the germinating spores *hmgR2* and *hmgR3* were active and did not show temperature dependence. Expression of both genes was inhibited by maltose and trehalose and *hmgR2* responded to salt stress. Our results show that transcription of *hmgR2* was highly affected by the environmental factors.

3. Over-expression and silencing of the *hmgR* genes.

Two different types of vectors were constructed, one series of vectors was built to overexpress the *hmgR* genes by elevating the copy number and changing their promoter to that of the *gpd1* gene (pNG series) and another series to silence them by antisense RNA-based gene silencing (pAS series). Vectors were transformed into the recipient MS12 strain using the PEG-mediated protoplast transformation method and transformed colonies were isolated. After analysis of the transformants to prove the presence of the transformed DNA, growing rate, macro- and micromorphology, carotenoid and ergosterol content and sensitivity to statins were tested.

Over-expression and silencing of *hmgR1* had no significant effect to the majority of the examined features. However, cytoplasm effusions could be detected during the microscopic examination of the silenced transformants and their ergosterol content was slightly decreased. In both types of transformants, necrotic cells and hyphae were detected.

Over-expression of *hmgR2* resulted in increased carotenoid and ergosterol contents and decreased sensitivity to statins in the transformants. Silencing of the gene also led to cytoplasm effusions and we could detect necrotic cells and hyphae as well.

Similarly to the changes detected in case of *hmgR2*, over-expression of *hmgR3* increased the carotenoid and ergosterol content and decreased the sensitivity to statins of the transformants. Silencing of this gene caused altered morphology in the transformants with irregular, swollen hyphae and cytoplasm effusions and increased hyphal branching. Carotenoid and ergosterol content decreased significantly in these strains and we could detect the early stage of apoptosis. It seems that *hmgR3* has role in spore germination and morphogenesis.

4. Subcellular localization of the HmgR proteins.

To analyse the subcellular localization of the HmgR proteins, the transmembrane region of each reductase was fused with green fluorescent protein (GFP). With these fusion proteins we could follow the localization of reductases in the cell. After PEG mediated protoplast transformation the transformed colonies were isolated. We have started to analyse the transformed strains with fluorescent microscopy and it was found that all three proteins are localized in large regions in the cell, but the HmgR2 also appeared in a number of not well-defined compartments. To get the exact localization of the proteins we stained the endoplasmic reticulum and the mitochondria, and samples were analysed by confocal microscopy. The HmgR2 and HmgR3 showed a clear co-localization to the endoplasmic reticulum, but not to the mitochondria.

The following main features of the *M. circinelloides* *hmgR* genes and the encoded proteins were observed in this study:

Under aerobic conditions the *hmgR1* gene is active in the hyphae and during the sporulation. Relative transcription level of this gene was significantly lower than those of the *hmgR2* and *hmgR3*. Temperature dependent gene expression was observed only in case of *hmgR1*. Under anaerobic conditions the activity of this gene significantly decreased. Ergosterol and carotenoid production of fungus was not affected by the altered expression of the gene (i.e. increase of the copy number or silencing), but it may have role in cytoplasmic integrity. HmgR1 typically appeared in spores and germ tubes and possibly localizes to the endoplasmic reticulum.

HmgR2 displayed strong transcription activity under aerobic and anaerobic conditions and this gene showed the highest transcription level under aerobic cultivation condition during the whole life cycle of the fungus. Relative transcription level of this gene was also high during the germination of the sporengiospores. Expression of *hmgR2* increased

proportionally with increasing salt concentration, but trehalose and maltose decreased the transcription activity. Overexpression of the gene significantly increased the carotenoid and ergosterol content of the transformants and decreased their sensitivity to statins. Ergosterol biosynthesis is one of the most important target for antifungal therapies and HMG-CoA reductase inhibitors are intensively researched (Galgóczy et al. 2011). As HMG-CoA reductase has important role in ergosterol biosynthesis, functional testing of *hmgR2* may be useful in finding and developing new antifungal agents. With the silencing of the gene, carotenoid and ergosterol content of the transformant strains decreased and cytoplasmic integrity was also effected. HmgR2 is associated in the endoplasmic reticulum but may also be localized in other small compartments in the cell.

Oxygen content of the environment affected the expression of *hmgR3*; relative transcription level of the gene significantly increased under anaerobic conditions. Expression of the gene seems to be important during spore germination and sporulation. Temperature dependent gene expression or response to osmotically changed environment were not found but maltose and trehalose inhibited the gene expression. *HmgR3* plays important role in the carotenoid biosynthesis and it also has influence in the ergosterol biosynthesis. *HmgR3* and *hmgR2* may be possible targets to create new carotenoid producing strains. Silencing the *hmgR3* gene significantly decreased the carotenoid content of transformants; macromorphology of strains changed and we could detect apoptosis-like processes. Spores of the silenced strains lost germinating ability and germination time was delayed. In zygomycetes, apoptotic processes are not investigated, so *hmgR3* can be an excellent target for such studies. It seems HmgR3 localizes in the endoplasmic reticulum.

As a result of our research, new information was obtained about the terpene biosynthesis of *M. circinelloides*. Our results also contribute to the investigation of morphogenesis, detection of cell stress response pathway and apoptotic processes in *Mucor*. Furthermore, the results can be used to analyse the regulation of the carotenoid and ergosterol biosynthesis in this organism and to develop new carotenoid producer strains for the industry, as well as in studies to find new targets for antifungal therapy.

9. IRODALOMJEGYZÉK

ABOUSHADI N., SHACKELFORD J.E., JESSANI N., GENTILE A., KRISANS S.K. (2000) **Characterization of peroxisomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in UT2 cells: sterol biosynthesis, phosphorylation, degradation, and statin inhibition.** *Biochemistry* 39(1): 237-247.

AGARWALL B., HENDWALL S.B., HALMOS B., MOSS S.F., RAMEY W.G., HOLT P.R. (1999) **Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells.** *Clin. Cancer. Res.* 5: 2223-2229.

ALCAZAR-FUOLI L., MELLADO E., GARCIA-EFFRON G., LOPEZ J.F., GRIMALT J.O., CUENCA-ESTRELLA J.M., RODRIGUEZ-TUDELA J.L. (2008) **Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*.** *Steroids* 73: 339-347.

ANRADE-PAVÓN D., SÁNCHEZ-SANDOVAL E., ROSALES-ACOSTA B., IBARRA J.A., TAMIREZ J., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ C., VILLA-TANACA L. (2013) **The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductases from fungi: A proposal as a therapeutic target and as a study model.** *Rev. Iberoam. Micol.* 31(1): 81-85.

BARKLEY S.J., CORNISH R.M., POULTER C.D. (2004) **Identification of an archaeal type II iopentenyl diphosphate isomerase in *Methanothermobacter thermautotrophicus*.** *J. Bacteriol.* 186: 1811-1817.

BASSON M.E., MOORE, R.L., O'REAR J., RINE J. (1987) **Identifying mutations in duplicated functions in *Saccharomyces cerevisiae*: Recessive mutations in HMG-CoA reductase genes.** *Gen. Society America* 117: 645-655.

BASSON M.E., THORSNESS M., RINE J. (1986) ***Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5563-5567.

BASSON M.E., THORSNESS M.K., FINER-MOORE J., STROUD R. AND RINE J. (1988) **Structural and functional conservation between yeast and human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis.** *Mol. Cell. Biol.* 9: 3797-3808.

BEJARANO, E.R. AND CERDÁ-OLMEDO, E. (1992) **Independence of the carotene and sterol pathways of *Phycomyces*.** *FEBS Lett.* 306(2-3): 209-212.

BENNY G.L. (2001) **Zygomycota: Trichomycetes.** Systematics and Evolution. The Mycota. McLaughlin D.J., McLaughlin K.G., Lemke P.A. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Vol. VII PartA, pp. 147-160.

BENNY G.L., HUMBER R.A., MORTON J.B. (2001) **Zygomycota: Zygomycetes.** Systematics and Evolution. The Mycota. McLaughlin D.J., McLaughlin K.G., Lemke P.A. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Vol. VII PartA, pp. 113-146.

- BHOSALE P. (2004) **Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 351-361.
- BIDLE K.A., HANSON T.E., HOWEL K., NANNEN J. (2007) **HMG-CoA reductase is regulated by salinity at the level of transcription in *Haloferax volcanii*.** *Extremophiles* 11: 49-55.
- BOGUSKI M.S., MCCORMICK F. (1993) **Proteins regulating Ras and its relatives.** *Nature* 366(6456): 643-654.
- BOURNE H.R., SANDERS D.A., MCCORMICK, F. (1990) **The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions.** *Nature* 348(6297): 125-132.
- BREITLING R., KRISANS S.K. (2002) **A second gene for peroxisomal HMG-CoA reductase? A genomic reassessment.** *J. Lipid Resch.* 43: 2031-2036.
- BRITTON G., LIAAEN-JENSEN S., PFANDER H. (2008) **Carotenoids–Natural functions**, Vol. 4. Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin.
- BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. (1999) **A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(20): 11041-11048.
- BURG J.S., ESPENSHADE P.J. (2011) **Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast.** *Prog. Lipid Res.* 50: 403-410.
- BURMESTER A., CZEMPINSKI K. (1994) **Sequence comparison of a segment of the gene for 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase in zygomycetes.** *Eur. J. Biochem.* 220: 403-408.
- BURTON G.W. (1989) **Antioxidant action of carotenoids.** *J. Nutrition* 119: 109-111.
- CAELLES C., FERRER A., BALCELLS L., HEGARDT F.G., BORONAT A. (1989) **Isolation and structural characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase.** *Plant Mol. Biol.* 13(6): 627-38.
- CARDOZA R.E., HERMOSA M.R., VIZCAÍNO J.A., GONZÁLEZ F., LLOBELL A., MONTE E., GUTIÉRREZ S. (2007) **Partial silencing of a hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase-encoding gene in *Trichoderma harzianum* CECT 2413 results in a lower level of resistance to lovastatin and lower antifungal activity.** *Fungal Genet. Biol.* 44: 269-283.
- CARTER J.P. (1988) **Gamma-linoleic acid as a nutrient.** *Food Technol.* 6: 72-82.
- CHAMILOS G., LEWIS R.E., KONTOYIANNIS D.P. (2006) **Lovastatin has significant activity against Zygomycetes and interacts synergistically with voriconazole.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(1): 96-103.
- CHANDRA L.T., DEEBA P., TALIB D., RENEE M.G., RANDOLPH Y.H. (2011) **The Sterol-sensing Domain (SSD) Directly Mediates Signal-regulated Endoplasmic Reticulum-associated Degradation (ERAD) of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA Reductase Isozyme Hmg2.** *J. Biol. Chem.* 286(30): 26298-26307.

CHAYAKULKEEREE M., GHANNOUM M.A., PERFECT J.R. (2006) **Zygomycosis: the re-emerging fungal infection.** *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25: 215-229.

CHEW B.P. (1993) **Role of carotenoids in the immune response.** *J. Dairy Sci.* 76: 2804-2811.

CHEW B.P., PARK J.S., WONG M.W., WONG T.S. (1999) **A comparison of the anticancer activities of dietary β -carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo.** *Anticancer Res.* 19: 1849-1853.

CROXEN R., GOOSEY M.W., KEON J.P., HARGREAVES J.A. (1994) **Isolation of an *Ustilago maydis* gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and expression of a C-terminal-truncated form in *Escherichia coli*.** *Microbiology* 140(9): 2363-2370.

DAVIES J.P. AND IOANNOU Y.A. (2006) **The role of the Niemann-Pick C1-like 1 protein in the subcellular transport of multiple lipids and their homeostasis.** *Curr. Opin. Lipidol. Review.* 17(3): 221-226.

DELLAS N., THOMAS S.T., MANNING G., NOEL J.P. (2013) **Discovery of a metabolic alternative to the classical mevalonate pathway.** *eLife* DOI: 10.7554/eLife.00672

DIMSTER-DENK D., RINE J. (1996) **Transcriptional regulation of a sterol-biosynthetic enzyme by sterol levels in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol. Cell Biol.* 16: 3981-89.

DUFOSSÉ L. (2006) **Microbial Production of Food Grade Pigments.** *Food Technol. Biotechnol.* 44(3): 313-321.

DUFOSSÉ L. (2009) **Microbial and Microalgal Carotenoids as Colourants and supplements.** In: Carotenoids Volume 5: Nutrition and Health, Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Eds.) Springer Science & Business Media pp. 83-98.

DUTOIT R., DE RUYCK J., DURISOTTI V., LEGRAIN C., JACOBS E., WOUTERS J. (2008) **Overexpression, physicochemical characterization, and modelling of a hyperthermophilic *Pyrococcus furiosus* type 2 IPP isomerase.** *Proteins* 71: 1699-1707.

ELLIS R.W., DEFEO D., SHIH T.Y., GONDA M.A., YOUNG H.A., TSUCHIDA N., LOWY D.R., SCOLNICK E.M. (1981) **The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes.** *Nature* 292(5823): 506-511.

Engfelt W.H., Shackelford J.E., Aboushadi N., Jessani N., Masuda K., Paton V.G., Keller G.A., Krisans S.K. (1997) **The characterization of the UT-2 cells. The induction of peroxisomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A.** *J. Biol. Chem.* 272: 24579-24587.

ESPENSHADE P.J. (2006) **SREBPs: sterol-regulated transcription factors.** *J. Cell Sci.* 119: 973-76.

FRIESEN J.A., RODWELL V.W. (2004) **The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductase.** *Proteins* 71: 1699-1707.

GALGÓCZY L., NYILASI I., PAPP T., VÁGVÖLGYI CS. (2009) **Are statins applicable for the prevention and treatment of zygomycosis?** *Clin. Infect. Dis.* 49: 483-484.

GALGÓCZY L., LUKÁCS G., NYILASI I., PAPP T., VÁGVÖLGYI CS. 2010 **Antifungal activity of statins and their interaction with amphotericin B against clinically important Zygomycetes.** *Acta. Biol. Hung.* 61(3): 356-365.

GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., BAIRDOCH A. (2005) **Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server.** The Proteomics Protocols Handbook John M. Walker (ed): Humana Press pp. 571-607

GENSCHIK P., CRIQUI M-C., PARMENTIER Y., MARBACH J., DURR A., FLECK J., JAMET E. (1992) **Isolation and characterization of a cDNA encoding a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Nicotiana sylvestris*.** *Plant Mol. Biol.* 20: 337-341.

GERTLER FB., CHOI-YING C., RICHTER-MANN L., CHIN DJ. (1988) **Developmental and metabolic regulation of the *Drosophila melanogaster* 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase.** *Mol. Cell. Biol.* 8: 2713-2721.

GHORMADE V., PATHAN E., DESHPANDE M.V. (2012) **Yeast-hypha dimorphism in Zygomycetous fungi.** Dimorphic fungi: Their importance as models for differentiation and fungal pathogenesis. Ruiz-Herrera J. (ed): Bentham eBooks ISBN: 978-1-60805-510-4 pp. 87-105.

GODTFREDSEN S.E. (1990) **Microbial lipases.** Microbial enzymes and biotechnology. Fogarty W.M., Kelly C.T. (ed.): 2nd ed., Elsevier, London, UK, pp. 255-274.

GOLDSTEIN J.L. AND BROWN M.S. (1990) **Regulation of the mevalonate pathway.** *Nature* 343: 425-430.

GOODAY G.W. (1994) **Hormones in mycelial fungi.** Growth, Differentiation and Sexuality, The Mycota. Wessels J.G.H., Meinhardt F. (ed.), Vol. I. Springer-Verlag, Berlin, pp. 401-411.

GRYGANSKYI A.P., MUSZEWSKA A. (2014) **Whole genome sequencing and the Zygomycota.** *Fungal Genom. Biol.* 4(1): <http://dx.doi.org/10.4172/2165-8056.1000e116>

HAMBROCK A., LÖFFLER-WALZ C., QUAST U. (2002) **Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides.** *Br. J. Pharmacol.* 136(7): 995-1004.

HAMPTON R.Y., RINE J. (1994) **Regulated degradation of HMG-CoA reductase, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum in yeast.** *J. Cell. Biol.* 125: 299-312.

HAN B.Z., ROMBOUTS F.M., NOUT M.J.R. (2001) **A Chinese fermented soybean food.** *Int. J. Food. Microbiol.* 65: 1-10.

- HEIDL M., TABERNEIRO L., STAUFFACHER C.V., RODWELL V.W. (2004) **Class II 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase**. *J. Bacteriol.* 188: 3192-3198.
- HENNEKENS C.H., MAYRENT S.L., WILLETT W. (1986) **Vitamin A, carotenoids, and retinoids**. *Cancer* 58(8 Suppl): 1837-1841.
- HIBBETT D.S., BINDER M., BISCHOFF J.F., BLACKWELL M., CANNON P.F. ÉS MTSI. (2007) **A higher-level phylogenetic classification of the Fungi**. *Mycol. Resch.* 111 (5): 509-547.
- HOFMANN, K., STOFFEL, W. (1993). **TMbase - A database of membrane spanning proteins segments**. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 347: 166.
- HORNBY J.M., JENSEN E.C., LISEC A.D., TASTO J.J., JAHNKE B., SHOEMAKER R., DUSSAULT P., NICKERSON K.W. (2001) **Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol**. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (7): 2982-2992.
- HORTON J.D., GOLDSTEIN J.L., BROWN M.S. (2002) **SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver**. *J. Clin. Invest.* 109: 1125-1131.
- HUGHES A.L., LEE C.Y., BIEN C.M., ESPENSHADE P.J (2007) **4-methyl sterols regulate fission yeast SREBP-Scap under low oxygen and cell stress**. *J.Biol. Chem.* 282(33): 24388-96.
- HUGHES A.L., TODD B.L., ESPENSHADE P.J. (2005) **SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast**. *Cell* 120: 831-42.
- ISTVAN E.S., PALNITKAR M., BUCHANAN S.K., DEISENHOFER J. (2000) **Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis**. *EMBO J.* 19(5): 819-830.
- ITURRIAGA E.A., DÍAZ-MINGUEZ J.M., BENITO E.P., ÁLVAREZ M.I., ESLAVA A.P. (1992) **Heterologous transformation of *Mucor circinelloides* with the *Phycomyces blakesleeanus leu1* gene**. *Curr. Genet.* 21: 215-223.
- ITURRIAGA E.A., PAPP T., BREUM J., ARNAU J., ESLAVA A.P. (2005) **Strain and culture conditions improvement for β -carotene production in *Mucor***. *Microbial Processes and Products. Methods in Biotechnology*. Barredo, J.-L. (ed.), Humana Press, USA, Vol. XVIII, pp. 239-256.
- ITURRIAGA E.A., VELAYOS A., ESLAVA A.P. (2000) **Structure and function of genes involved in the biosynthesis of carotenoids in the Mucorales**. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 5: 263-274.
- ITURRIAGA E.A., VELAYOS A., ESLAVA A.P., ALVAREZ M.I. (2001) **The genetics and molecular biology of carotenoid biosynthesis in *Mucor***. *Recent Res. Dev. Genet.* 1: 79-92.
- JOHNSON E.A. AND SCHROEDER W.A. (1995) **Microbial carotenoids**. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.* 53: 119-178.

JOO J.H., JETTEN A.M. (2010) **Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis.** *Cancer lett.* 287(2): 123-35.

KANEDA K., KUZUYAMA T., TAKAGI M., HAYAKAWA Y., SETO H. (2001) **An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces* sp. strain CL190.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98(3): 932-937.

KATAOKA T., POWERS S., MCGILL C., FASANO O., STRATHERN J., BROACH J. AND WIGLER M. (1984) **Genetic analysis of yeast RAS1 and RAS2 genes.** *Cell* 37(2): 437-445.

KELLER G.A., PAZIRANDEH M., KRISANS S. (1986) **3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase localization in rat liver peroxisomes and microsomes of control and cholestyramine-treated animals: Quantitative biochemical and immunoelectron microscopical analyses.** *J. Cell Biol.* 103: 875-886.

KONING A.J., ROBERTS C.J., WRIGHT R.L. (1996) **Different subcellular localization of *Saccharomyces cerevisiae* HMG-CoA reductase isozymes at elevated levels corresponds to distinct endoplasmic reticulum membrane proliferations.** *Mol. Biol. Cell* 7: 769-789.

KUZINA V., CERDÁ-OLMEDO E. (2007) **Ubiquinone and carotene production in the Mucorales *Blakeslea* and *Phycomyces*.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 991-999.

KUZINA V., DOMENECH C., CERDÁ-OLMEDO E. (2006) **Relationships among the biosyntheses of ubiquinone, carotene, sterols, and triacylglycerols in Zygomycetes.** *Arch. Microbiol.* 186: 485-49.

LEARNED R.M., FINK G.R. (1989) **3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Arabidopsis thaliana* is structurally distinct from the yeast and animal enzymes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(8): 2779-2783.

LEIVAR P., GONZÁLES V.M., CASTELAS S., TRELEASE R.N., LÓPEZ-IGLESIAS C., ARRÓ M., BORONAT A., CAMPOS N., FERRER A., FERNÁNDEZ-BUSQUETS X. (2005) **Subcellular localization of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase.** *Plant Phys.* 137: 57-69.

LISCUM L., FINER-MOORE J., STROUD R.M., LUSKEY K.L., BROWN M.S., GOLDSTEIN J.L. (1985) **Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum.** *J. Biol. Chem.* 260: 522-530.

LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D. (2001) **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method.** *Methods* 25(4): 402-408.

LOFTUS S.K., MORRIS J.A., CARSTEAD E.D., GU J.Z., CUMMINGS C., BROWN A., ELLISON J., OHNO K., ROSENFELD M.A., TAGLE D.A., PENTCHEV P.G., PAVAN W.J. (1997) **Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene.** *Science* 277(5323): 180-181.

LOMBARD J., MOREIRA D. (2011) **Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life.** *Mol. Boil. Evol.* 28(1): 87-99.

- LUKÁCS GY., PAPP T., SOMOGYVÁRI F., CSERNETICS Á., NYILASI I., VÁGVÖLGYI CS. (2009) **Cloning of the *Rhizomucor miehei* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase gene and its heterologous expression in *Mucor circinelloides***. *Ant. Leeuwenhoek* 95(1): 55-64.
- LUM P.Y., EDWARDS S., WRIGHT R. (1996) **Molecular, functional and evolutionary characterization of the gene encoding HMG-CoA reductase in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe***. *Yeast* 12: 1107-1124.
- MADYASTHA K.M., SRIVATSAN J. (1987) **Novel transformations of progesterone by a *Mucor* sp.** *Can. J. Microbiol.* 33: 361-365.
- MEHTA B.J., OBRAZTSOVA I.N., CERDÁ-OLMEDO E. (2003) **Mutants and intersexual heterokaryons of *Blakeslea trispora* for production of β -carotene and lycopene**. *Appl. Envir. Microbiol.* 69 (7): 4043-4048.
- MISAWA N. (2011) **Pathway engineering for functional isoprenoids**. *Curr. Biotech.* 22(5): 1-7.
- MISAWA N. AND SHIMADA H. (1997) **Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts**. *J. Biotechnol.* 59: 169-181.
- MOORE K.B. AND OISHI K.K. (1993) **Characterization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity during maize seed development, germination, and seedling emergence**. *Plant Phys.* 101: 485-491.
- MORTENSEN A. (2006) **Carotenoids and other pigments as natural colorants**. *Pure Appl. Chem.* 78(8): 1477-1491.
- MOSQUEDA-CANO G., GUTIERREZ-CORONA J.F. (1995) **Environmental and developmental regulation of carotenogenesis in the dimorphic fungus *Mucor rouxii***. *Curr. Microbiol.* 31(3): 141-145.
- NAGUIB Y.M. (2000) **Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids**. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1150-1154.
- NAGY G, CSERNETICS Á, BENCSIK O, SZEKERES A, VÁGVÖLGYI CS, PAPP T. (2012) **Carotenoid composition of *Mucorales* fungi**. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6: 7265-7270.
- NAVARRO E., RUIZ-PÉREZ V.L., TORRES-MARTÍNEZ S. (2000) **Overexpression of the *crgA* gene abolishes light requirement for carotenoid biosynthesis in *Mucor circinelloides***. *Eur. J. Biochem.* 267: 800-807.
- NELSON, A.J., DOERNER, P.W., ZHU, Q., LAMB, C.J. (1994) **Isolation of a monocot 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase gene that is elicitor-inducible**. *Plant Mol. Biol.* 25: 401-412.
- NGUYEN A.D., McDONALD J.G., BRUICK R.K., DEBOSE-BOYD R.A. (2007) **Hypoxia stimulates degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase through**

accumulation of lanosterol and hypoxia-inducible factor-mediated induction of insigs. *J Biol. Chem.* 282:27436-27446.

NICKERSON W.J. (2006) **Experimental control of morphogenesis in microorganisms.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 60: 50-57.

NISHINO H., MURAKOSH M., II T., TAKEMURA M., KUCHIDE M., KANAZAWA M., MOU X.Y., WADA S., MASUDA M., OHSAKA Y., YOGOSAWA S., SATOMI Y., JINNO K. (2002) **Carotenoids in cancer prevention.** *Cancer Metastasis Rev.* 21: 257-264.

OLENDER E.H., SIMONI R.D. (1992) **The intracellular targeting and membrane topology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase.** *J. Biol. Chem.* 267:4223-4235.

ONG T.P., HEIDOR R., DE CONTI A., DAGLI M.L., MORENO F.S. (2006) **Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMG-CoA reductase.** *Carcinogenesis* 27(6): 1194-1203.

ORLOWSKY M. (1991) **Mucor dimorphism.** *Microbiol. Rev.* 55: 234-258.

ORLOWSKY M. (1994) **Growth, differentiation and sexuality.** Growth, Differentiation and Sexuality, The Mycota. Wessels J.G.H., Meinhardt F. (ed.), Springer Verlag, Vol. I, pp. 143.

ORSET S., YOUNG A.J. (1999) **Low-temperature-induced synthesis of α -carotene in the microalga *Dunaliella salina* (chlorophyta).** *J. Phycology* 35(3): 520-527.

OUTTRUP H., BOYCE C.O.L. (1990) **Microbial proteinases and biotechnology.** Microbial enzymes and biotechnology. Fogarty W.M., Kelly C.T. (ed.), Elsevier Applied Science Publ., London, pp. 227-254.

PAGNI M., IOANNIDIS V., CERUTTI L., ZAHN-ZABAL M., JONGENEEL C.V., HAU J., MARTIN O., KUZNETSOV D., FALQUET L. (2007) **MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences.** *Nucleic Acids Res.* (Web Server issue): W433-437.

PAIVA S.A.R., RUSSEL, R.M. (1999) **β -carotene and other carotenoids as antioxidants.** *J. Nutrition* 5: 426-433.

PAPP T., NAGY G., CSERNETICS Á., SZEKERES A., VÁGVÖLGYI CS. (2009) **Beta-carotene production by Mucoralean fungi.** *J. Eng. Ann. Fac. Eng. Huned.* 7: 173-176.

PAPP T., NYILASI I., CSERNETICS Á., GALGÓCZY L., VÁGVÖLGYI CS. (2008) **Molecular studies on Zygomycetes fungi causing opportunistic infections.** *Rev. Med. Microbiol.* 19(2): 39-46.

PAPP T., VELAYOS A., BARTÓK T., ESLAVA A.P., VÁGVÖLGYI CS., ITURRIAGA E.A. (2006) **Heterologous expression of astaxanthin biosynthesis genes in *Mucor circinelloides*.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69(5): 526-531.

PAPP T., CSERNETICS Á., NAGY G., BENCSIK O., ITURRIAGA E.A., ESLAVA A.P., VÁGVÖLGYI CS. (2013) **Canthaxanthin production with modified *Mucor circinelloides* strains.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 4937-4950.

POOT M., ZHANG Y.Z., KRÄMER J.A., WELLS K.S., JONES L.J., HANZEL D.K., LUGADE A.G., SINGER V.L., HAUGLAND R.P. (1996) **Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains.** *J. Histochem. Cytochem.* 44(12): 1363-1372.

POWERS S., KATAOKA T., FASANO O., GOLDFARB M., STRATHERN J., BROACH J., WIGLER M. (1984) **Genes in *S. cerevisiae* encoding proteins with domains homologous to the mammalian ras proteins.** *Cell* 36(3): 607-612.

QIAO J., KONTOYIANNIS D.P., WAN Z., LI R., LIU W. (2007) **Antifungal activity of statins against *Aspergillus* species.** *Med. Mycol.* 45: 589-593.

RAMSDALE M. (2006) **Death-related signalling pathway.** Programmed cell death and apoptosis in Fungi. The Mycota. Brown A.J.P., Esser K. (ed.), Springer, Berlin, Heidelberg, Vol. XIII, pp. 113-138.

RIBES J.A., VANOVER-SAMS C.L., BAKER D.J. (2000) **Zygomycetes in Human Disease.** *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 236-301.

RODRIGUEZ-AMAYA D.B. (2001) **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods.** Washington: OMNI Research, ILSI Press.

ROITELMAN J., OLENDER E. H., BAR-NUN S., DUNN W. A., SIMONI R. D. (1992) **Immunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: implications for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum.** *J. Cell Biol.* 117: 959-973.

ROZE L.V., LINZ J.E. (1998) **Lovastatin triggers an apoptosis-like cell death process in the fungus *Mucor racemosus*.** *Fungal Genet. Biol.* 25(2): 119-133.

RUIZ-ALBERT J., CERDA-OLMEDO E., CORROCHANO L.M. (2002) **Genes for mevalonate biosynthesis in *Phycomyces*.** *Mol Genet Genomics.* 266(5): 768-777.

RUIZ-HERRERA J. (1993) **Dimorphism in *Mucor* species.** Dimorphic fungi in biology and medicine. van den Bossche H. Odds F.C., Herridge D. (ed.), Plenum Press, New York, pp. 257-265.

SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989) **Molecular cloning: A laboratory manual.** Cold Spring Harbor, New York.

SHARMA S.C. (2006) **Implications of sterol structure for membrane lipid composition, fluidity and phospholipid asymmetry in *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Yeast Res.* 6(7): 1047-1051.

SCHILDE C., WÖSTEMEYER J., BURMESTER A. (2001) **Green fluorescent protein as a reporter for gene expression in the mucoralean fungus *Absidia glauca*.** *Arch. Microbiol.* 175: 1-7.

SCHIMEK C., KLEPPE K., SALEM A.-R., VOIGT K., BURMESTER A., WÖSTEMEYER J. (2003) **Sexual reactions in Mortierellales are mediated by the trisporic acid system.** *Mycol. Res.* 107: 736–747.

SEILER S., PLAMANN M. (2003) **The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*.** *Mol. Biol. Cell.* 14(11): 4352–4364.

SEONG K., LI L., HOU Z., MILES T., KISTLER H.C., XU J. (2006) **Cryptic promoter activity in the coding region of the HMG-CoA reductase gene in *Fusarium graminearum*.** *Fungal Genet. Biol.* 43: 34–41.

SHIMOMURA O., JOHNSON F.H., SAIGA Y. (1962) **Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*.** *J. Cell. Comp. Physiol.* 59: 223–239.

SHIRTLIFF M.A., KROM B.P., MEJIERING R.A.M., PETERS B.M., ZHU J., SCHEPER M.A., HARRIS M.L., JABRA-RIZK M.A. (2009) **Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(6): 2392–2401.

SILVIA F., TORRES-MARTÍNEZ S., GARRE V. (2006) **Distinct white collar-1 genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*.** *Mol. Microbiol.* 61(4): 1023–1037.

SMITH S.J., CROWLEY J.H., PARKS L.W. (1996) **Transcriptional regulation by ergosterol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol. Cell Biol.* 16: 5427–5432.

SOM T., KOLAPARTHI V.S. (1994) **Developmental decisions in *Aspergillus nidulans* are modulated by Ras activity.** *Mol. Cell Biol.* 14(8): 5333–5348.

STERMER B.A., BIANCHINI G.M., KORTH K. L. (1994) **Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants.** *J. Lipids Resch.* 35: 1133–1140.

TODD B.L., STEWART E.V., BURG J.S., HUGHES A.L., ESPENSHADE P.J. (2006) **Sterol regulatory element binding protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission yeast.** *Mol. Cell Biol.* 26: 2817–2831.

TSIEN R.Y. (1998) **The green fluorescent protein.** *Annu. Rev. Biochem.* 67: 509–544.

TUSNÁDY G.E., SIMON I. (2001) **The HMMTOP transmembrane topology prediction server.** *Bioinformatics* 17(9): 849–850.

VAINIO H. AND RAUTALAHTI M. (1998) **An international evaluation of the cancer preventive potential of carotenoids.** *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7: 725–728.

VAN HEESWIJK R., RONCERO M.I.G. (1984) **High frequency transformation of *Mucor* with recombinant plasmid DNA.** *Carlsberg Res. Commun.* 49: 691–702.

VAN LAAR T.A., LIN Y.H., MILLER C.L., KARNA S.L.R., CHAMBERS J.P., SESHU J. (2012) **Effect of levels of acetate on the mevalonate pathway of *Borrelia burgdorferi*.** *PLoS ONE* 7:e38171.

- VAUPOTIČ T. AND PLEMENITAŠ A. (2007) **Osmoadaptation-dependent activity of microsomal HMG-CoA reductase in the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* is regulated by ubiquitination.** *FEBS Letters* 581: 3391-3395.
- VAUPOTIČ T., VERANIC P., PETROVIČ U., GUNDE-CIMERMAN N., PLEMENITAŠ A. (2008) **HMG-CoA reductase is regulated by environmental salinity and its activity is essential for halotolerance in halophilic fungi.** *Stud. Mycol.* 61: 61-66.
- VELAYOS A., LÓPEZ-MATAS M.A., RUIZ-HIDALGO M.J., ESLAVA A.P. (1997) **Complementation analysis of carotenogenic mutants of *Mucor circinelloides*.** *Fungal Genet. Biol.* 22: 19-27.
- VELAYOS A., BLASCO J.L., ALVAREZ M.I., ITURRIAGA E.A., ESLAVA A.P. (2000a) **Blue-light regulation of phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides*.** *Planta* 210: 938-946.
- VELAYOS A., ESLAVA A.P., ITURRIAGA E.A. (2000b) **A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*.** *Eur. J. Biochem.* 267: 1-12.
- VERWAAL R., WANG J., MEIJNEN J-P., VISSER H., SANDMANN G., VAN DEN BERG J.A., VAN OUYEN A.J.J (2007) **High-Level production of beta-carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*.** *Appl Environ. Microbiol.* 73(13): 4342-4350.
- VIK A., RINE J. (2001) **Upc2p and Ecm22p, dual regulators of sterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol. Cell Biol.* 21(19): 6395-405.
- VOJTEK A.B., CHANNING J.D. (1998) **Increasing complexity of the Ras signaling pathway.** *J. Biol. Chem.* 273: 19925-19928.
- WALSH T.J., GROLL A., HIEMENZ J., FLEMING R., ROILIDES E., ANAÏSSIE E. (2004) **Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens.** *Clin. Microbiol. Infect.* 10(S1): 48-66.
- WARD O. (1995) **Microbial production of long-chain PUFAs.** *Inform.* 6: 683-688.
- YAMADA H., SHIMIZU S., SHINMEN Y., AKIMOTO K., KAWASHIMA H., JAREONKITMONGKOL S. (1992) **Production of dihomogamma-linolenic acid, arachidonic acid, and eicosapentaenoic acid by filamentous fungi.** Industrial applications of single cell oils. Champaign I.L. (ed.), American Oil Chemists Society Press (AOCS), USA Illinois, pp. 118-138.
- YAN G-L., WEN K-R., DUAN C-Q. (2012) **Enhancement of β -carotene production by over expression of HMG-CoA reductase coupled with addition of ergosterol biosynthesis inhibitors in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.** *Curr. Microbiol.* 64(2): 159-163.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Vágvölgyi Csabának, a Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar, Mikrobiológiai Tanszék vezetőjének, hogy a tanszéken munkámat lehetővé tette, figyelemmel kísérte és támogatta.

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Papp Tamásnak, áldozatos munkájáért, aki munkámat mindvégig támogatta, megosztotta velem széleskörű elméleti és gyakorlati szaktudását és megadott minden segítséget munkám sikeres elvégzéséhez.

Külön köszönettel tartozom Dr. Nyilasi Ildikónak, Dr. Csernetics Árpádnak, Dr. Linka Beátának, Dr. Galgóczy Lászlónak a sok hasznos tanácsért, ötletadó beszélgetésért és elméleti valamint gyakorlati segítségnyújtásért.

Köszönöm minden közvetlen munkatársamnak, Dr. Krizsán Krisztinának, Petkovits Tamásnak, Czikora Máténak, Tóth Eszternek, Farkas Anitának, Páll Orsolyának a laborban nyújtott nélkülözhetetlen segítségüket, barátságukat.

Köszönettel tartozom Ferhan Ayaydinnak, hogy lehetővé tette és segítette a konfokális mikroszkóppal történő vizsgálatokat az SZBK Mikroszkópos sejtanalízis laborban. Köszönöm Dr. Szekeres Andrásnak és Bencsik Ottónak a HPLC kísérletek során nyújtott segítségüket. Meg szeretném köszönni Dr. Victoriano Garre-nak a lehetőséget, hogy a laborjában elsajátíthattam a Northern-hibridizációs technikát.

Köszönetemet fejezem ki Lele Máriának, Deákné Kulcsár Melindának, valamint Farkas Elvirának a munkám során nyújtott technikai segítségért, valamint Dr. Palágyi Andrásnének, Kreisch Istvánnénak, Szőnyi Jánosnénak és Lengyel Boglárkának, hogy a munkámmal kapcsolatos hivatalos ügyeket intézték. Köszönet illeti továbbá a Mikrobiológiai Tanszék minden munkatársát és dolgozóját.

Külön köszönet illeti Borsos Barbarát mind elméleti, mind pedig a gyakorlati segítségéért, ötletadó beszélgetésekért és nem utolsósorban a barátságáért.

Hálával tartozom a páromnak, Dr. Nagy Adriennek, aki mindvégig mellettem állt, támogatott, és szeretetével erősítette a munkámat.

És végezetül, de nem utolsósorban hálával és köszönettel tartozom szüleimnek, akik egész életem folyamán önzetlenül, feltétel nélkül támogattak, és szeretetükkel mindvégig biztos hátteret nyújtottak.

11. MELLÉKLET

1. melléklet. A *M. circinelloides* HMG-KoA reduktáz génjeinek genomi DNS szekvenciái az intronokkal, valamint a génekről átíródó feltételezett fehérjék aminosav sorrendje. A sárga háttérrel jelzett nukleotidok mutatják az intronszekvenciákat.

1. A *hmgR1* gén teljes szekvenciája és az általa kódolt feltételezett fehérje aminosavsorrendje

ATG ATC AAT CTG CTG TCC TAT AAA TCC ATC ACT GGC TTC ATG AAC CGG CTG GTG	54
M I N L L S Y K S I T G F M N R L V	18
CTC AAG ACA TCT AAA GTA TCC GCC TTG AAC CCT ATA GAA ACG ATG GTA GCA AGT	108
L K T S K V S A L N P I E T M V A S	36
CTG ATT TTG GGG TCT GTG ACC TAC GTC TAC CTG TTC AAT CTA GCG AAA TCG TCA	162
L I L G S V T Y V Y L F N L A K S S	54
GAG ATA CTG TCC ACA GCC AGC ATC TAC GAC ACA TCG TTT GTG TCC ACC ATC CTG	216
E I L S T A S I Y D T S F V S T I L	72
TAC GCT TCT CCA AAC GAC ATT TCG TTT TCG CCA TTA AAG CAA GAT CCT CCA TTA	270
Y A S P N D I S F S P L K Q D P P L	90
CCA GCA GTA TCG ATA TCG CGT ATT GAA CTC AAG CAG ATC GCC ATC GCC TTG ACG	324
P A V S I S R I E L K Q I A I A L T	108
GAT CCC GCA CAT CAG CAC AAC ATG GAT GCC ATC CAG CGT TTT CGC AAT CAT GTT	378
D P A H Q H N M D A I Q R F R N H V	126
GAA TCC ACT CCA GTC GAT TTC TCC GAT TTA GAG CAT CAA GAA AAG GGG CTA ATG	432
E S T P V D F S D L E H Q E K G L M	144
ACA TAC AAA GAC CAC TTG TGC TAC AAT GCT TCC ACA ACG TGT CTG ACA TGC CAG	486
T Y K D H L C Y N A S T T C L T C Q	162
CCA TTC AAT CGA GAC AAC AGT GCG ATT CTG TCG TAT GTG TTT GAT CTG AGC AAT	540
P F N R D N S A I L S Y V F D L S N	180
GAT CAG CGT ATT AAG GCC TCT CAT TTA TGG GAC CAA AAG GTC ATG TCA TCT TCC	594
D Q R I K A S H L W D Q K V M S S S	198
GTG GAC AGA CTC ATT CCT ATG GCG ACA CAA CAT CAA TAC AAC GAG AGG AGT ATC	648
V D R L I P M A T Q H Q Y N E R S I	216
AGC ACA GTC GTG TGG TTG ATT CGG ATT ATG AAG AAC ATT GCT AGA GAT ACA GCC	702
S T V V W L I R I M K N I A R D T A	234
GTG CGC ATG AAT gtaagaaacggacatgctcatcagaatgcaacatgtagctaataccaccaatag	768
V R M N	238
AGT GCT TCC AAG ATG GAT GTG ATT GTA GTA ACA GCA GGC TAC ATT ATG ATG GCC	822
S A S K M D V I V V T A G Y I M M A	256
TTC ACC TTC TTA TCA CTG TAT ATC AGA ATG CAT AAA TTG GGA TCA AAA TAT ACT	876
F T F L S L Y I R M H K L G S K Y T	274
CTA G gtaagtggtaaacactattgaaacgcccattgtgtgttatcagggaaaaaaaacaaacaaacaaa	945
L	275
ttaatttaaccttttag CA ACC ACT ATC TTC ATG TCG GGT TTC TTT TCA TTT ATG	1000
A T T I F M S G F F S F M	288
CTC TCT CTG GCC ACC GTG TAT AAA TTG GGC GCA CCT GTC AGT CCT GTT TTA TTG	1054
L S L A T V Y K L G A P V S P V L L	306
AG gtt tgtacgggtttattatggagcatgtcgtatacatggggcttctctttttaacagaaaaaaaacc	1123
S	307
tcatcag T GAA GCA ACG CCG TTT TTG GTA GTG ACG ATA GGA TTC GAA CGG CCC	1176
E A T P F L V V T I G F E R P	322
TAC AAA CTC ACC AAA TGC ATA TTC GAG CAA GAA AGC AAC AAT ACC GAC AAC AGT	1230
Y K L T K C I F E Q E S N N T D N S	340
AAT GTG CTG CAA ATC ATC TCA CGC TCT GTG GAA ATG ATG GCA CCA ACC TTG ATT	1284
N V L Q I I S R S V E M M A P T L I	358
CGA GAT GGA CTA TTG GAG ATT GTG GTA TTC ATA CTG GGC GCC AAA TCA ACA TTG	1338
R D G L L E I V V F I L G A K S T L	376
CCT GGA TTG CGC GAG TTC TGT CTG ATG AGT GCA TTT TTG ATT GCT TAC GAC ATG	1392
P G L R E F C L M S A F L I A Y D M	394

ATG TTG ATG TTT ACT TGG TAC ATT TCA GTC TTG TCA TTA AAG TTG GAG gtaacag	1447
M L M F T W Y I S V L S L K L E	410
aaaagacacggtaaaaacaaacgatgcatgctataacgatgattgtttgcag	1513
L R K I K	415
GAG ACA ACC TCG ACT AGT ACC ACG ACG ACG ACA TCT ATT CTT GAA ACA GCA GCA	1567
E T T S T S T T T T T S I L E T A A	433
GCA ACC AGC CAA GTA GCA TCC ACT TCC ACT ACC ACC ATC AAC GAC TCC CAT CAT	1621
A T S Q V A S T S T T I N D S H H	451
GCA CGA AAC AAG AAG CCA GCT ATC ATC AAG ACC AAA TTG CTC ATG gtaaggccccc	1677
A R N K K P A I I K T K L L M	466
cccagagatatatacatggcagcctgttaactgacatggaagcag	1739
I I G F L T	472
ATG CAC GTA TTT GAA TTT TGC TCC ACT CTG TCC TTC TCA ACA TCC AGA AAC AAC	1793
M H V F E F C S T L S F S T S R N N	490
TCA CAT GCC TTG CCT CAA GTG CCT GTC ATA GGA CCT ACT ATC GAG CCA GTC TTG	1847
S H A L P Q V P V I G P T I E P V L	508
TCC CAT ATT CTA AAG CAG CAG AGA TTG TCT GGC TCA ACA AAC GGC TTA CTG CTT	1901
S H I L K Q H R L S G S T N G L L L	526
AAA GTA TCA CCG ACG ATC CAC TTC CAG CTA TTA GCC CAA ACA CAT TTC CAA CGA	1954
K V S P T I H F Q L L A Q T H F Q R	544
CTT CCG CCT GTG AAA AGC TTG CTA GCC GAG ATC TAC AAC ACA TAC GCT GTT TAC	2009
L P P V K S L L A E I Y N T Y A V Y	562
GCA CAG GAT CCT GTC ATC AGC AAA TGG GTG GTC GCT ATT TTG ATG GTG TCC ATC	2063
A Q D P V I S K W V V A I L M V S I	580
CTT CTC AAC ACC TAT CTG TTT GAG ATT GCC AAA TAC AAT CGA CAA ACA GCG CAA	2117
L L N T Y L F E I A K Y N R Q T A Q	598
CGA AAT CAA CCT ATT CAA GAG CTT CGC TCT GTA CCT ATC ACC TCG CCC AGA TTG	2171
R N Q P I Q E L R S V P I T S P R L	616
CGA TCC GCT ATC AGC GCT TCA CCT GTA CTG AAC TCA AAT TTG ACA AGC AAA	2225
R S A I S A S S P V L N S N L T S K	634
AGA CGT CCC TCT CAA AGC ACA TCC ACC ACA CCA AGA CAT CGA AAT AAG AAG CAG	2279
R R P S Q S T S T T P R H R N K K Q	652
CAG CAG CAG CAG CAG CAG CCT CAG TTG GGC ATG CGT ACA GTC GAA GAG TGT CTC	2333
Q Q Q Q Q Q P Q L G M R T V E E C L	670
CAT ATC CTC AGA GAC ATA GAT CAG GGC GCA TCG CAT CTT GCC GAC GAA GAG ATT	2387
H I L R D I D Q G A S H L A D E E I	688
GTT CTA CTA GTC CAA CAT GCT CAT ATT GCT CCC TAC GCT CTG GAA AAA GTA TTG	2441
V L L V Q H A H I A P Y A L E K V L	706
GGT GAT TTG GAA CGG GCT GTG CAC ATC CGC AAG ACT GTG ATT TCT CGG TCC TCC	2495
G D L E R A V H I R K T V I S R S S	724
ATT ACG CAA ACA CTC GAG TCA AGC GCA TTA CCA GTG GCA GAG TAT GAT TAC GAC	2549
I T Q T L E S S A L P V A E Y D Y D	742
AAG GTC TTG GGT GCT TGC GAG AAT GTG ATT GGA TAC ATG CCG ATA CCC GTG	2603
K V L G A C C E N V I G Y M P I P V	7760
GGT GTC GCT GGC CCC ATG ATG ATT GAT GGT GAG AGC ATC CAT TTA CCC ATG GCA	2657
G V A G P M M I D G E S I H L P M A	778
ACC ACC GAG GGA TGT CTT GTT GCG TCT GTT GCA CGT GGT TGC AAA GCT GTC AAT	2711
T T E G C L V A S V A R G C K A V N	796
GTC AAT GGT GCC ACC ACG GTG TTG ATC TCG GAC GGT ATG ACG CGC GGC CCT TGT	2765
V N G A T T V L I S D G M T R G P C	814
GTC GAG TTT CCC AAC ATC ATT GAT GCT GGC CTA TGC AAG CGC TGG CTG GAT CAG	2819
V E F P N I I D A G L C K R W L D Q	832
GAG GAG GGA TTT GAG ATT GTA GCA GAG GCT TTC AAC AGC ACA TCC AGG TTT GCT	2873
E E G F E I V A E A F N S T S R F A	850
CGG GTG CGT AAA ATG CAG GTA GCA ATG GCC GGC AAG CTG CTG TAC ATT CGA TTC	2927
R V R K M Q V A M A G K L L Y I R F	868
TCT ACG ACA ACA GGC GAC GCA ATG GGC ATG AAC ATG ATT TCC AAA GGC TGC GAA	2981
S T T T G D A M G M N M I S K G C E	886
AAG GCA CTC TCA AAG ATT GCA GAG TAT TTT CCA ACC ATG CAA ATT GTA TCT CTC	3035
K A L S K I A E Y F P T M Q I V S L	904
TCA GGC AAC TAT TGC ACA GAC AAG AAG CCG GCA GCC ATC AAC TGG ATT GAA GGA	3089
S G N Y C T D K K P A A I N W I E G	922
CGC GGA AAA TCG GTT GTA GCA GAG GCT GTG ATC CCC AGC AGT GTC GTA CAA AAG	3143
R G K S V V A E A V I P S S V V Q K	940
GTG CTC AAG ACA ACA GTG GAG GCC CTA GTC GAG TTG AAC ATT TCA AAG AAT CTG	3197
V L K T T V E A L V E L N I S K N L	958

ATA	GGA	TCT	GCC	ATG	GCT	GGG	TCG	GTG	GGT	GGA	TTC	AAT	GCA	CAT	GCA	GCC	AAT	3251
I	G	S	A	M	A	G	S	V	G	G	F	N	A	H	A	A	N	976
ATC	TTG	ACG	GCC	ATG	TAC	ATT	GCA	GTA	GGA	CAG	GAT	CCG	GCG	CAG	AAT	GTA	GAG	3305
I	L	T	A	M	Y	I	A	V	G	Q	D	P	A	Q	N	V	E	994
AGC	AGC	AAT	TGT	ATC	ACC	CTG	ATG	AAG	TCG	GTC	AAC	AAT	GGA	TCG	GCG	CTG	CAC	3359
S	S	N	C	I	T	L	M	K	S	V	N	N	G	S	A	L	H	1012
ATT	TCA	TGC	AGC	ATG	CCC	AGT	ATT	GAG	GTG	GGC	ACG	GTC	GGT	GGC	GGC	ACC	ATC	3413
I	S	C	S	M	P	S	I	E	V	G	T	V	G	G	G	T	I	1030
TTG	CCC	CCG	CAA	CAA	GCC	ATG	CTG	GAC	ATG	CTT	GGT	GTG	CGA	GGT	CCT	CAT	CCA	3467
L	P	P	Q	Q	A	M	L	D	M	L	G	V	R	G	P	H	P	1048
ACA	CAT	CCA	GGT	AAA	AAT	GCT	CAG	AAA	CTG	GCG	AGG	ATC	ATC	TGC	GCT	GCT	GTC	3521
T	H	P	G	K	N	A	Q	K	L	A	R	I	I	C	A	A	V	1066
ATG	GCG	GGT	GAG	CTT	TCG	TTA	TGT	GCG	GCT	CTG	GCA	GCA	GGG	CAT	TTG	GTT	AAG	3575
M	A	G	E	L	S	L	C	A	A	L	A	A	G	H	L	V	K	1084
GCG	CAC	ATG	CAA	CAC	AAC	CGA	GTA	TCC	ACT	GCT	GCT	GCT	GCT	GCT	GTT	CCG	GCT	3629
A	H	M	Q	H	N	R	V	S	T	A	A	A	A	A	V	P	A	1102
GTC	GAA	AAC	GAC	ATT	CAC	AAG	AAA	AAG	GCA	CTC	AAG	ACT	CCC	GCT	TCA	ACA	CCG	3683
V	E	N	D	I	H	K	K	K	A	L	K	T	P	A	S	T	P	1120
AGA	TCT	TTG	CAG	TCG	AGG	CAG	AGT	ACA	GTG	CCT	GTA	ACG	GGA	AAT	TGC	ATC	TTA	3737
R	S	L	Q	S	R	Q	S	T	V	P	V	T	G	N	C	I	L	1137
TAG																		3740
-																		

2. A *hmgR2* gén teljes szekvenciája és az általa kódolt feltételezett fehérje aminosavsorrendje

ATG	TTG	AAA	AAC	GTC	AAA	AAA	GAT	AAC	CCG	TTC	CGA	TAT	TTG	GCT	CAT	GTA	TCC	54	
M	L	K	N	V	K	K	D	N	P	F	R	Y	L	A	H	V	S	18	
GCG	CGA	AAT	CCA	TTT	GAA	ATG	ATG	GTC	GCC	GTA	TTC	ATC	GCA	TGC	TCA	TTC	TCC	108	
A	R	N	P	F	E	M	M	V	A	V	F	I	A	C	S	F	S	36	
TAT	CTA	TAC	CTC	ACA	AAC	ACC	TAC	AAC	AAA	GGG	TTG	CAT	GAC	ATG	ACA	TCC	ACT	162	
Y	L	Y	L	T	N	T	Y	N	K	G	L	H	D	M	T	S	T	54	
CAC	CCC	ATT	GCC	TAT	TAC	CAT	AGC	AAC	CAG	TCA	ACG	CAT	CAC	CAT	GGA	AAC	AGC	216	
H	P	I	A	Y	Y	H	S	N	Q	S	T	H	H	H	G	N	S	72	
AAT	GAC	GAC	AAC	AAG	AGT	GTC	ATT	CTA	AAG	CAG	CTG	GTA	TTG	CAC	CAC	CGT	CAG	270	
N	D	D	N	K	S	V	I	L	K	Q	L	V	L	H	H	R	Q	90	
GAC	ATG	ATG	ACC	AAA	GAG	GCC	CTC	CAA	TCT	GTG	CTC	TCA	TTC	CAA	GAA	TCA	CTG	324	
D	M	M	T	K	E	A	L	Q	S	V	L	S	F	Q	E	S	L	108	
GCG	CAG	GAT	ATT	TCT	GAA	TTT	TGT	TAT	CGC	AAT	GAA	GAC	AAT	GAT	TGC	GTT	ATC	378	
A	Q	D	I	S	E	F	C	Y	R	N	E	D	N	D	C	V	I	126	
AAG	AGT	CCC	TTA	AAT	TTC	TGG	AAT	AAC	AGC	ATT	GCT	AAA	TTA	AAT	GCA	GAT	AGA	432	
K	S	P	L	N	F	W	N	N	S	I	A	K	L	N	A	D	R	144	
AAT	GTC	AAA	TCA	ACT	ATT	TAT	CAG	CAG	CAG	CAG	CAG	CAT	GAC	CAA	AGC	CAT	TAT	486	
N	V	K	S	T	I	Y	Q	Q	Q	Q	Q	H	D	Q	S	H	Y	162	
TTC	CTG	ATG	AAT	CAT	CAC	AAC	AAT	TAT	GCA	GAT	GCT	GTC	GTG	CTA	TCT	TTT	GTG	540	
F	L	M	N	H	H	N	N	Y	A	D	A	V	V	L	S	F	V	180	
TTT	GAT	GGA	TCG	CAA	CAG	GAT	CGA	GTC	AAT	CAG	TGG	GAG	CAC	AAT	ATT	GCT	AAA	594	
F	D	G	S	Q	Q	D	R	V	N	Q	W	E	H	N	I	A	K	198	
TTG	GGT	CCT	ATC	TTT	AGC	CAT	CAA	TCA	AAA	CAA	CCA	AAC	TAC	ATG	ACA	ATG	ATT	648	
L	G	P	I	F	S	H	Q	S	K	Q	P	N	Y	M	T	M	I	216	
TTT	GAT	CAT	GCC	AAG	CGA	CTA	TAC	AAG	gtataccatttgcattggttgcgatttgcagtcgaag									710	
F	D	H	A	K	R	L	Y	K										225	
aagctcattgctgaaatatgatag								ACC	GCC	AAT	CCT	GTG	GAT	CTG	CTT	CTC	TTG	ACC	767
								T	A	N	P	V	D	L	L	L	L	T	236
AGT	GGT	TAT	GTC	TTC	ATG	TTT	ATA	ACC	CTG	ATC	AAT	CTC	TTT	TAC	AGC	CTG	CGA	821	
S	G	Y	V	F	M	F	I	T	L	I	N	L	F	Y	S	L	R	254	
AAA	GTG	GTG	GGA	TCA	TAC	TGC	ATT	ATT	GGA	TCA	GCT	GTT	ATT	TTG	AAT	GGC	ATA	875	
K	V	V	G	S	Y	C	I	I	G	S	A	V	I	L	N	G	I	272	
TGT	GCG	CTT	GTG	TTT	GGC	CTC	ACT	GCC	ATG	AAG	CTG	CTG	CAT	GTC	AAC	ATC	ACA	929	
C	A	L	V	F	G	L	T	A	M	K	L	L	H	V	N	I	T	290	
CCC	GCC	CTG	TTA	CT	gtaggtccatcttatgatttagcgattggcatgtgcttatttctttctggtta													995	
P	A	L	L	L														295	
g	T	GAA	TCA	CTG	CCG	TTT	CTC	GTT	ATT	ACC	ATT	GGA	TTT	GGA	CGA	CAC	ATC	AAG	1048
	E	S	L	P	F	L	V	I	T	I	G	F	G	R	H	I	K		312

TAC	ACG	AAA	TCG	ATT	TTA	AGC	AAC	ACA	AAC	AAT	AAC	AAC	GAC	AAC	TCC	GTT	TTC	1102
Y	T	K	S	I	L	S	N	T	N	N	N	N	D	N	S	V	F	330
ATG	ATG	CTC	GCT	TGG	GAT	TGT	TTC	ACT	GAA	ATT	ACT	ATC	TTT	TGT	CTT	GGT	GCC	1156
M	M	L	A	W	D	C	F	T	E	I	T	I	F	C	L	G	A	348
AAA	TCT	GGT	ATT	AGC	GGG	CTC	AGG	GAG	TTT	TGC	TGG	TTA	AGC	GCT	TGT	TTA	TTG	1210
K	S	G	I	S	G	L	R	E	F	C	W	L	S	A	C	L	L	366
GCG	TTT	GAT	TTT	GTG	CTC	CTT	TGC	ACT	TGG	TAC	ACA	GCC	ATA	TTG	GCT	TTA	AAC	1264
A	F	D	F	V	L	L	C	T	W	Y	T	A	I	L	A	L	K	384
CTG	GAG	gtaattggccttgtgttttcatacatttgggaagaggatgttttgtttgtgtaatgatgatt																1330
L	E																	386
tatattgtgttattccttag					CTG	AAT	CGA	TTC	AAT	ACG	GCA	GAC	GAG	ATC	AAG	CAC	CAG	1388
					L	N	R	F	N	T	A	D	E	I	K	H	Q	392
CCA	AGC	AAC	TAC	AGC	AGC	GCA	TCT	GTT	TGG	CAT	TGG	ATC	CTG	GAA	AAG	ATG	AAG	1442
P	S	N	Y	S	S	A	S	V	W	H	W	I	L	E	K	M	K	417
CTG	TTC	ATG	gtaaagtgcaggcaagactggatgggggttttactcgttgagccatcaaacatttg															1507
L	F	M																420
aaaaatttttcttctctattgattacagttaaactaacgcaccaattacaaaatttggcttcgtag																		1575
ATT	GTA	GGC	TTT	ATA	GGA	ATG	CAT	ATC	TTT	AAA	GTT	TGC	TCC	ACT	TTC	CAA	CAA	1629
I	V	G	F	I	G	M	H	I	F	K	V	C	S	T	F	Q	Q	438
GAA	CCT	CTT	TCA	TTC	ACT	ACT	GTA	GAT	ACT	AGT	CAG	CCA	ACC	GTC	GCC	TTT	GTA	1683
E	P	L	S	F	T	T	V	D	T	S	Q	P	T	V	A	F	V	456
TTA	TCT	GAA	CTA	CTG	GAT	AAG	CAA	CCA	CTC	GTC	AAA	GTA	TTT	CCA	AAC	CAG	TAT	1737
L	S	E	L	L	D	K	Q	P	L	V	K	V	F	P	N	Q	Y	474
TTC	TAT	GCT	GTA	ATA	TCA	CCA	TCT	GCT	ACT	TGT	TTT	TCC	ACA	TCC	TCT	CTA	TTT	1791
F	Y	A	V	I	S	P	S	A	T	C	F	S	T	S	S	L	F	492
CAA	CAA	TAT	CAA	CTT	TAT	TAC	ATT	ATG	ATC	AAG	CCC	TTT	GAG	AGC	CTA	TTC	GAC	1845
Q	Q	Y	Q	L	Y	Y	I	M	I	K	P	F	E	S	L	F	D	510
ATT	TAC	GCT	GTC	TAT	ATT	CAA	CAT	CCC	GTT	ATA	TCC	AAA	TGG	CTG	ACT	ATC	GCT	1899
I	Y	A	V	Y	I	Q	H	P	V	I	S	K	W	L	T	I	A	528
CTC	TGT	GTC	TCC	CTA	TTC	CTC	AAT	ACC	TAT	CTG	TTC	AAT	GTA	GCA	AAG	CAG	CAA	1953
L	C	V	S	L	F	L	N	T	Y	L	F	N	V	A	K	Q	Q	546
CCA	AAA	GTA	GTG	GTA	CAA	AAA	GTT	ATT	GAA	AAG	GTC	CAA	GTA	CCT	GTG	CAG	GTT	2007
P	K	V	V	V	Q	K	V	I	E	K	V	Q	V	P	V	Q	V	564
CCA	GCT	GCC	AAG	AAG	GAA	AAG	AAG	GTT	GCT	CCC	GCA	TCT	CCA	TCC	GTA	GCC	ATG	2061
P	A	A	K	K	E	K	K	V	A	P	A	S	P	S	V	A	M	582
GCA	ACC	AAA	AAG	TCG	CAT	CAA	CAT	CAT	CAT	CAT	CAC	CAA	CAA	CAG	CAT	CAC		2115
A	T	K	K	S	H	Q	H	H	H	H	H	H	Q	Q	Q	H	H	600
CGC	TCT	GAT	ATC	GTA	CGC	CCC	TTG	GAT	GAA	GTG	TTC	AGT	TTA	ATC	GGT	ACG	CCT	2169
R	S	D	I	V	R	P	L	D	E	V	F	S	L	I	G	T	P	618
GAG	GTA	TTG	ACA	GAC	GAA	GAG	ATC	ATC	TCT	GTT	GTT	CAG	AGT	GGA	AAG	ATG	GCT	2223
E	V	L	T	D	E	E	I	I	S	V	V	Q	S	G	K	M	A	636
GCC	TAC	GCG	CTT	GAA	AAG	GTA	CTG	GGT	GAT	TTT	GAA	CGC	GCT	GTG	CAT	ATT	CGC	2277
A	Y	A	L	E	K	V	L	G	D	F	E	R	A	V	H	I	R	654
AGA	GCT	TTG	GTT	TCG	CGT	GAT	TCC	ATC	ACC	AAG	TCG	CTG	GAG	GGT	AGC	TTG	CTT	2331
R	A	L	V	S	R	D	S	I	T	K	S	L	E	G	S	L	L	672
CCT	GTC	AAG	AAC	TAC	CAC	TAT	GAC	AAG	GTG	ATG	GGT	GCA	TGT	TGT	GAA	AAC	GTG	2385
P	V	K	N	Y	H	Y	D	K	V	M	G	A	C	C	E	N	V	670
ATT	GGT	TAT	ATG	CCT	ATT	CCA	GTT	GGT	GTA	GCA	G	gtaaacacatatatacaaacaaaat						2444
I	G	Y	M	P	I	P	V	G	V	A								701
gcaaacatgacaagtgattgacagtggcacag									GT	CCA	TTG	AAC	ATT	GAC	GGC	GAT	CTG	2503
									G	P	L	N	I	D	G	D	L	703
ATC	CAT	ATT	CCC	ATG	GCC	ACT	ACA	GAA	GGC	TGT	TTG	GTG	GCT	TCA	GCT	GCT	CGA	2557
I	H	I	P	M	A	T	T	E	G	C	L	V	A	S	A	A	R	728
GGC	TGC	AAG	GCC	ATC	AAT	GCT	GGT	GGA	GGA	GCT	ACT	ACT	ATT	GTT	ACT	GCA	GAT	2611
G	C	K	A	I	N	A	G	G	G	A	T	T	I	V	T	A	D	746
GGC	ATG	ACC	CGT	GGA	CCC	TGT	GTT	GAA	TTC	CCA	GAC	ATT	CTC	CGT	GCA	GCC	GAT	2665
G	M	T	R	G	P	C	V	E	F	P	D	I	L	R	A	A	D	764
TGT	AAG	CGT	TGG	ATT	GAA	CAA	GAA	GGA	GAA	AAG	GTA	GTG	ACC	GAG	GCA	TTC	AAC	2719
C	K	R	W	I	E	Q	E	G	E	K	V	V	T	E	A	F	N	782
TCG	ACC	TCT	CGT	TTT	GCT	CGT	GTT	CGC	AAG	CTG	AAG	GTT	GCT	CTT	GCT	GGC	CGC	2773
S	T	S	R	F	A	R	V	R	K	L	K	V	A	L	A	G	R	800
TTA	ATG	TAC	ATT	CGA	TTC	TCT	ACT	ACG	ACT	GGC	GAT	GCT	ATG	GGC	ATG	AAT	ATG	2827
L	M	Y	I	R	F	S	T	T	T	G	D	A	M	G	M	N	M	818
ATT	TCA	AAG	GGC	TGT	GAA	AAG	GCA	CTG	TCC	AAG	ATT	GCA	GAG	AGA	TAT	CCC	GAT	2881
I	S	K	G	C	E	K	A	L	S	K	I	A	E	R	Y	P	D	836
ATG	CAA	ATC	ATT	TCT	CTT	TCT	GGC	AAC	TAC	TGT	ACC	GAC	AAG	AAG	CCT	GCT	GCT	2935
M	Q	I	I	S	L	S	G	N	Y	C	T	D	K	K	P	A	A	854

ATT	AAT	TGG	ATT	GAG	GGT	CGT	GGC	AAG	TCG	GTT	GTC	GCT	GAG	GCT	GTT	ATT	CCC	2989
I	N	W	I	E	G	R	G	K	S	V	V	A	E	A	V	I	P	872
GGT	GCT	GTC	GTT	GAG	AAG	GTC	CTC	AAA	ACC	ACT	GTC	GCT	GCT	CTT	GTG	GAA	TTG	3043
G	A	V	V	E	K	V	L	K	T	T	V	A	A	L	V	E	L	890
AAC	GTC	TCC	AAG	AAT	TTG	GTC	GGT	TCT	GCC	ATG	GCT	GGC	TCT	GTG	GGT	GGA	TTC	3097
N	V	S	K	N	L	V	G	S	A	M	A	G	S	V	G	G	F	908
AAT	GCA	CAC	GCT	GCT	AAC	ATT	TTG	ACC	GCC	ATC	TAC	CTC	GCT	ACA	GGC	CAA	GAT	3151
N	A	H	A	A	N	I	L	T	A	I	Y	L	A	T	G	Q	D	926
CCC	GCC	CAG	AAT	GTC	GAA	AGC	TCC	ATG	TGT	ATT	ACT	CTG	ATG	AAG	GCT	GTC	AAC	3205
P	A	Q	N	V	E	S	S	M	C	I	T	L	M	K	A	V	N	944
AAT	GAC	AAG	GAT	CTC	AAC	ATC	TCT	TGT	ACT	ATG	CCC	TGT	ATC	GAA	GTT	GGC	ACT	3259
N	D	K	D	L	N	I	S	C	T	M	P	C	I	E	V	G	T	962
ATT	GGT	GGT	GGT	ACT	ATC	TTA	CCC	CCT	CAA	CAA	GCC	ATG	CTG	GAT	TTC	CTT	GGT	3313
I	G	G	G	T	I	L	P	P	Q	Q	A	M	L	D	F	L	G	980
GTG	CGT	GGC	CCT	CAT	CCC	ACT	GAA	CCC	GGA	GCC	AAT	GCT	CGT	CGC	CTT	GCT	CGT	3367
V	R	G	P	H	P	T	E	P	G	A	N	A	R	R	L	A	R	998
ATC	ATC	TGT	GCC	TCT	GTG	ATG	GCT	GGT	GAG	CTC	TCT	CTC	TGT	GCT	GCT	TTG	GCC	3421
I	I	C	A	S	V	M	A	G	E	L	S	L	C	A	A	L	A	1016
GCT	GGA	CAT	TTG	GTC	CAG	GCC	CAC	ATG	GCT	CAC	AAC	CGT	AAC	ACT	GCT	GCT	GCT	3475
A	G	H	L	V	Q	A	H	M	A	H	N	R	N	T	A	A	A	1034
GCC	GCT	GCT	CCT	GCC	GCC	GCT	GCT	CCC	TCT	ATT	GCC	GCT	TCT	GTC	ATT	CAG	GCT	3529
A	A	A	P	A	A	A	A	P	S	I	A	A	S	V	I	Q	A	1052
TCT	ACT	CCT	CCT	GCT	ACT	CCA	GTT	GAA	AAA	GAG	GAC	CCA	ATT	CCT	GGA	AGT	TGT	3583
S	T	P	P	A	T	P	V	E	K	E	D	P	I	P	G	S	C	1070
TAG	ATT	AAA	TCA															3595
I	K	S	-															1073

3. A *hmgR3* gén teljes szekvenciája és az általa kódolt feltételezett fehérje aminosavsorrendje

ATG	GCG	TCT	GCT	CTC	CCC	CAT	CAT	TCT	GGA	ACC	AGC	GCC	TTT	CGG	TCC	ATT	TCC	54
M	A	S	A	L	P	H	H	S	G	T	S	A	F	R	S	I	S	18
AGC	GTC	TTT	GGC	AAA	GGC	ATC	CAC	CGT	GCC	GCC	AAG	CTC	TCG	TCT	CGC	AAC	CCC	108
S	V	F	G	K	G	I	H	R	A	A	K	L	S	S	R	N	P	36
ATC	GAG	ATG	ATT	GCG	GGC	ATC	CTG	ATT	CTG	TCG	TCC	TTT	AGC	TAC	TTT	TAC	CTG	162
I	E	M	I	A	G	I	L	I	L	S	S	F	S	Y	F	Y	L	54
TTC	AAT	CTG	GCC	CGC	ACG	TCC	GAC	ATC	TTT	TCT	GGC	ACG	GTC	ACC	CGT	CTG	TAT	216
F	N	L	A	R	T	S	D	I	F	S	G	T	V	T	R	L	Y	72
CCC	ACC	TCT	GTG	TAT	GCT	GAT	AAG	CAC	ACG	CAG	GGC	TTC	CAG	CAG	CTC	TCC	CGC	270
P	T	S	V	Y	A	D	K	H	T	Q	G	F	Q	Q	L	S	R	90
AAC	GAC	GCC	TCC	TTG	GAC	ACC	ACC	ACG	ACG	GAA	GAA	GCA	GTG	AAA	ATT	CAA	CTT	324
N	D	A	S	L	D	T	T	T	T	E	E	A	V	K	I	Q	L	108
CGA	CAA	ATC	TCC	ATC	GTG	GAT	CAG	GAA	AAG	AAC	GTG	ATT	GAC	AGA	AAC	ACA	TTG	378
R	Q	I	S	I	V	D	Q	E	K	N	V	I	D	R	N	T	L	126
GCT	ACC	ATT	CTT	CGC	TTC	CAA	AAC	ACC	ATT	GAC	CAC	ACG	CTG	CTG	GAC	GAC	CAC	432
A	T	I	L	R	F	Q	N	T	I	D	H	T	L	L	D	D	H	144
GTT	GGC	CAG	TTT	GGC	TAC	AGC	GCC	CTG	TGC	TTC	AAG	AAT	GCG	CAGGGA	GAG	TGC		486
V	G	Q	F	G	Y	S	A	L	C	F	K	N	A	Q	G	E	C	162
TTC	TCG	CAG	TCG	CTG	GCC	AAC	ATC	TTT	GAC	ATG	GAC	ACC	ATC	GAC	TCG	GAC	GAC	540
F	S	Q	S	L	A	N	I	F	D	M	D	T	I	D	S	D	D	180
CTG	CGA	CGA	TCC	ATC	AAC	CAG	CGC	CCT	GAA	CTG	GCT	GCC	TCC	ATC	TTT	GGC	GAG	594
L	R	R	S	I	N	Q	R	P	E	L	A	A	S	I	F	G	E	198
TTG	GAT	CTG	AAC	GCC	TCC	TCC	GCC	TCC	TCC	ATC	TTG	CTG	TCC	TTC	GCC	TTC	AAC	648
L	D	L	N	A	S	S	A	S	S	I	L	L	S	F	A	F	N	216
GCC	TCC	ACG	GAA	TAC	CGC	CAG	CAG	CTG	TCG	TAC	GCC	TGG	GAG	CAA	AAG	GTG	TCT	702
A	S	T	E	Y	R	Q	Q	L	S	Y	A	W	E	Q	K	V	S	234
ACG	CTG	TCC	TCT	GGC	GAC	CTT	GTG	TCG	CTC	TCC	AAC	ACG	GGA	CAC	CAA	GAA	GAC	756
T	L	S	S	G	D	L	V	S	L	S	N	T	G	H	Q	E	D	252
GTC	TTT	ACC	TGG	CTC	TTT	ATC	ATC	ACT	CGC	AAC	ATT	GTG	TAT	CGC	ATC	AAG	GAG	810
V	F	T	W	L	F	I	I	T	R	N	I	V	Y	R	I	K	E	270
CTG	ATC	GAC	ATG	GCA	GAC	AAC	ATT	GAC	ATT	ATC	GTC	ATT	TTG	GGC	GGC	TAC	ATG	864
L	I	D	M	A	D	N	I	D	I	I	V	I	L	G	G	Y	M	288
ATG	ATG	CTG	ACC	ACC	TTC	GTG	TCC	TTG	TAC	ATG	AAC	ATG	CGC	TCC	ATG	GGA	TCG	918
M	M	L	T	T	F	V	S	L	Y	M	N	M	R	S	M	G	S	306

CGC	TAC	ACA	CTC	GCC	ACG	GCC	GTC	GTG	GTC	AAC	GGC	TTC	TTT	TCA	TTC	ATG	TTT	972	
R	Y	T	L	A	T	A	V	V	V	N	G	F	F	S	F	M	F	324	
GCC	CTG	TTG	ACT	GTC	AAT	GCG	CTG	GGC	GTC	GAT	GTC	TAC	CCC	GTT	GTA	CTG	GC	1025	
A	L	L	T	V	N	A	L	G	V	D	V	Y	P	V	V	L	A	342	
gtgagtattatcatcgtgaagcatgtttgttctctctcagttctaaccaacccttggcatcatag																	T	GAG	1094
																	E	343	
GCC	ATT	CCC	TTT	TTG	GCG	GTT	ACC	ATT	GGT	TTT	GAG	CGT	CAT	TTC	AAG	CTT	ACC	1148	
A	I	P	F	L	A	V	T	I	G	F	E	R	H	F	K	L	T	361	
AAA	AGA	GTG	TTT	GAG	TTC	AGC	AAG	GAG	ACC	CCA	TTG	ACC	AAG	CAG	GAG	ATC	AGA	1202	
K	R	V	F	E	F	S	K	E	T	P	L	T	K	Q	E	I	R	379	
AAG	ACC	ATT	GTG	CGT	GCA	GTC	GAT	TCC	GTT	GCC	TTG	CCC	ATC	GCC	AGA	GAC	TGC	1256	
K	T	I	V	R	A	V	D	S	V	A	L	P	I	A	R	D	C	397	
ATC	ATG	GAA	ATC	ACG	GTG	CTG	GCA	CTG	GGC	GCC	AAG	TCT	GGC	ATC	TCT	GGC	TTG	1310	
I	M	E	I	T	V	L	A	L	G	A	K	S	G	I	S	G	L	415	
CGT	GAA	TTT	TGC	CTG	CTG	AGC	GCC	ATC	TTG	TTG	GCC	TAC	GAT	TTC	ATC	ATC	ATG	1364	
R	E	F	C	L	L	S	A	I	L	L	A	Y	D	F	I	I	M	433	
TTT	ACT	TGG	TAC	ACG	GCA	GTA	TTG	GCG	TTA	AAG	TTG	GAG	TTG	CTG	AGA	ATC	CGC	1418	
F	T	W	Y	T	A	V	L	A	L	K	L	E	L	L	R	I	R	451	
GAA	ATC	AAC	GGC	ACA	AGC	AAC	AAG	TCT	GCA	AAG	ACC	ACT	GGC	ACA	GGA	TAC	ATC	1472	
E	I	N	G	T	S	N	K	S	A	K	T	T	G	T	G	Y	I	469	
CGT	AGC	ACC	GTC	GTC	AAG	GCA	TTC	AGT	GAT	AGC	ACA	ACA	ACA	AAC	AAC	AGC	TCC	1526	
R	S	T	V	V	K	A	F	S	D	S	T	T	T	N	N	S	S	487	
AGC	ATC	AAG	ACG	GAC	GAG	CCC	ATC	ATT	GGC	AGA	GTG	AAG	CTC	TTG	ATG	gtaagct		1581	
S	I	K	T	D	E	P	I	I	G	R	V	K	L	L	M			503	
tacacagaaagccaagttttttgttattttgtttcaagctaacaacttttttattggggggggtgactcta																		1652	
tag	ATT	GTT	GGA	TTT	GTG	GCC	ATG	CAG	CTC	TTC	AAG	GTG	TGC	ACT	ACC	TTC	CAA	1706	
	I	V	G	F	V	A	M	Q	L	F	K	V	C	T	T	F	Q	520	
GGA	TCG	TCG	GGT	CCT	CAG	GTT	AGT	GTC	GTT	GAA	CCT	GGT	GTG	AAT	AAT	GTG	CTG	1760	
G	S	S	G	P	Q	V	S	V	V	E	P	G	V	N	N	V	L	538	
GAG	AAG	CTC	CTT	GAA	CAG	CAT	CGT	GCA	TCC	GAC	ATG	GGA	CAC	TTG	CCT	CTG	TTG	1814	
E	K	L	L	E	Q	H	R	A	S	D	M	G	H	L	P	L	L	556	
GTC	GAA	GTG	TTT	CCT	CCT	TTG	CCC	TTC	CAC	ATT	GCA	TCC	TCC	TCG	TAC	AAG	GCC	1868	
V	E	V	F	P	P	L	P	F	H	I	A	S	S	S	Y	K	A	574	
ATC	GTT	CCT	GAC	AGC	ATC	CGC	CAG	CCG	TTG	GAC	TAT	TTG	CTC	GAG	ACA	TAT	GCC	1922	
I	V	P	D	S	I	R	Q	P	L	D	Y	L	L	E	T	Y	A	592	
GTC	TAC	ATT	CAG	CAT	CCC	GTC	ATC	TCC	AAG	TGG	ATC	ACA	CTT	GCT	CTG	TTT	GTA	1976	
V	Y	I	Q	H	P	V	I	S	K	W	I	T	L	A	L	F	V	610	
TCC	TTG	TTC	TTG	AAC	ACT	TAC	CTC	TTC	AAG	GTA	GCC	AAG	CAA	CCC	GCC	AAG	GCT	2030	
S	L	F	L	N	T	Y	L	F	K	V	A	K	Q	P	A	K	A	628	
GCT	CCT	GCT	GCT	GCT	GCC	GAG	ACC	AAG	AAA	TCA	ACA	CCA	ACA	GTA	GTA	CCC	ACC	2084	
A	P	A	A	A	A	E	T	K	K	S	T	P	T	V	V	P	T	646	
ATT	ACC	ACG	GCT	GAA	AGA	AAG	ACA	CAA	CAC	CAC	CAC	CAC	CAC	CAA	AAG	CAC	AGC	2138	
I	T	T	A	E	R	K	T	Q	H	H	H	H	H	Q	K	H	S	664	
AGC	AAA	CAT	TCC	GCC	GTT	CAA	GGC	GTC	ATT	CGC	ACA	CTG	GAA	GAA	TGC	ATG	CAA	2192	
S	K	H	S	A	V	Q	G	V	I	R	T	L	E	E	C	M	Q	682	
CTG	ACA	CAA	ACA	CCC	GAA	TCT	CTG	TCT	GAC	GAA	GAA	GTC	ATC	ATG	CTA	GTT	CAA	2246	
L	T	Q	T	P	E	S	L	S	D	E	E	V	I	M	L	V	Q	700	
AAG	GGC	AAG	ATG	GCC	TCC	TAT	GCG	CTG	GAA	AAG	GTG	CTG	GGC	GAT	TTG	GAG	CGT	2300	
K	G	K	M	A	S	Y	A	L	E	K	V	L	G	D	L	E	R	718	
GCT	GTC	AGT	ATC	CGT	CGT	GCC	TTG	GTC	TCT	CGT	GCC	TCC	ATC	ACA	AAG	ACA	CTG	2354	
A	V	S	I	R	R	A	L	V	S	R	A	S	I	T	K	T	L	736	
GAA	TCC	AGT	CTG	TTG	CCT	CTC	CAC	AAC	TAC	CAC	TAT	GAC	AAG	GTG	ATG	GGC	GCC	2408	
E	S	S	L	L	P	L	H	N	Y	H	Y	D	K	V	M	G	A	754	
TGT	TGC	GAA	AAC	GTC	ATT	GGC	TAC	ATG	CCT	ATT	CCT	GTC	GGT	GTC	GCT	GGT	CCC	2462	
C	C	E	N	V	I	G	Y	M	P	I	P	V	G	V	A	G	P	772	
ATG	AAC	ATT	GAC	GGT	GAC	TCG	ATT	CAT	ATC	CCC	ATG	GCA	ACC	ACA	GAA	GGC	TGT	2516	
M	N	I	D	G	D	S	I	H	I	P	M	A	T	T	E	G	C	790	
TTG	ATT	GCA	TCG	GCT	GCC	AGA	GGT	TGT	AAG	GCA	ATC	AAT	GCC	GGC	GGA	GGT	GCA	2570	
L	I	A	S	A	A	R	G	C	K	A	I	N	A	G	G	G	A	808	
ACC	ACG	ATC	ATT	ACT	GCT	GAT	GGC	ATG	ACC	CGT	GGC	CCT	TGT	GTG	GAA	TTC	CCT	2624	
T	T	I	I	T	A	D	G	M	T	R	G	P	C	V	E	F	P	826	
TCC	ATC	ATT	GGC	GCT	GCT	GCT	TGC	AAA	AAG	TTC	ATT	GAA	GAA	GAT	GGC	GCT	GAA	2678	
S	I	I	G	A	A	A	C	K	K	F	I	E	E	D	G	A	E	844	
ATC	ATC	ACG	GCT	GCA	TTC	AAC	TCG	ACC	TCC	CGA	TTT	GCT	CGC	TTG	AGA	AAG	CTA	2732	
I	I	T	A	A	F	N	S	T	S	R	F	A	R	L	R	K	L	862	
AAG	GTG	GCT	CTC	GCC	GGC	AGA	CTG	GTC	TTT	ATC	CGA	TTC	TCT	ACC	ACG	ACC	GGT	2786	
K	V	A	L	A	G	R	L	V	F	I	R	F	S	T	T	T	G	880	

[illegible]